

Die oxidative Glykolsäurebildung in isolierten
intakten Spinatchloroplasten

Jörg-Dietrich Eickenbusch

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die oxidative Glykolsäurebildung in isolierten
intakten Spinatchloroplasten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Jörg-Dietrich Eickenbusch
aus
München

Juni 1975



1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Beck
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
- Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1975

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1. Pflanzenmaterial	10
2.2. Isolierung intakter Spinatchloroplasten	10
2.3. Untersuchung des bei der Isolierung intakter Spinatchloroplasten entstehenden Anteils an "broken chloroplasts"	11
2.4. Präparation osmotisch aufgebrochener Chloro- plasten zur Ermittlung des biogenetischen Vorläufers der Glykolsäure	14
2.5. Versuchsaufbau am Oxigraphen	15
2.6. Versuchsdurchführung in der Küvette des Oxigraphen	17
2.6.1. Versuchsgang	17
2.6.2. Deutung des entstandenen Kurvenbildes	20
2.7. Aufarbeitung der Proben	22
2.8. Trennverfahren	22
2.8.1. Papierchromatographie	22
2.8.2. Hochspannungselektrophorese	23
2.8.3. Säulenchromatographische Auftrennung des Chloroplastenextraktes	24
2.9. Kolorimetrische Bestimmung und Identifizie- rung der bei der Säulenchromatographie er- haltenen Glykolsäure	26
2.10. Überprüfung der säulenchromatographischen Gly- kolsäureisolierung hinsichtlich Ausbeute und Reinheit	27

	Seite
2.10.1. Ausbeute	27
2.10.2. Reinheit der säulenchromatographisch iso- lierten Glykolsäure	28
2.11. Lokalisation von Substanzen auf den Papier- chromatogrammen und Papierpherogrammen	31
2.12. Identifizierung einzelner Flecken auf den Chromatogrammen	31
2.13. Messung der Radioaktivität	32
2.13.1. Messung der Radioaktivität gelöster Sub- stanzen	32
2.13.2. Messung der Radioaktivität von Substanzen auf Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen..	34
2.14. Chemischer Abbau von Glykolsäure zur Ermitt- lung der intramolekularen ^{14}C -Verteilung	34
2.15. Applikation verschiedener radioaktiv markier- ter Zuckerphosphate an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem	36
2.15.1. Präparative Darstellung von radioaktiv mar- kiertem Ribulose-5-Phosphat	36
2.15.2. Präparative Darstellung von radioaktiv mar- kiertem Ribulose-1,5-diphosphat	37
2.15.3. Reinigung von radioaktiv markiertem Sedoheptulose-1,7-diphosphat	37
2.15.4. Präparative Darstellung von radioaktiv mar- kierter 3-Phosphoglycerinsäure	38
2.15.5. Bezug der übrigen verwendeten Chemikalien	38

2.15.6.	Applikation von ^{14}C -markierten Substanzen an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem	39
2.16.	Herstellung der für die Chloroplastenpräparation verwendeten Puffer	41
2.17.	Überprüfung der Puffer auf ihren CO_2 -Gehalt ..	42
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Abhängigkeit der Glykolatproduktion vom O_2 -Partialdruck	44
3.1.1.	Untersuchung der Glykolatproduktion bei sättigendem CO_2 -Angebot	44
3.1.2.	Kinetikversuche zur Überprüfung der physiologischen Homogenität der ^{14}C -Fixierung während des gewählten Zeitraums von drei Minuten.	51
3.1.3.	Der Einfluß des Alters der Chloroplastenpräparation auf die Glykolatbildung	54
3.2.	Charakterisierung der zwei glykolsäureproduzierenden Reaktionen	57
3.2.1.	Der Einfluß der CO_2 -Konzentration auf die Glykolatbildung	57
3.2.2.	Einfluß des O_2 -Partialdruckes auf die Glykolatproduktion bei limitierendem CO_2 -Angebot	63
3.2.3.	Vergleich der Bildung von Glykolat und anderen Stoffwechselprodukten unter Rotlicht und Weißlicht	66

3.2.4.	Kinetikversuche zur Überprüfung der Abhängigkeit des linearen Einbaus von ^{14}C in Glykolat von der Linearität der CO_2 -Fixierung	71
3.3.	Versuche zur Identifizierung der Vorläuferverbindungen der oxidativen Glykolatproduktion ..	74
3.3.1.	Kinetik der ^{14}C -Markierung bei sehr kurzen Fixierungszeiten	74
3.3.2.	Die ^{14}C -Markierung der einzelnen Kohlenstoffatome der Glykolsäure	81
3.3.3.	Vergleich der Vorläufereffektivität verschiedener Verbindungen für die Bildung von Glykolsäure bei niedrigem und hohem O_2 -Partialdruck.	83
4.	Diskussion der Ergebnisse	87
4.1.	Charakterisierung der beiden glykolsäurebildenden Reaktionen	87
4.1.1.	Die von exogenem Sauerstoff unabhängige Bildung der Glykolsäure (Reaktion "A")	87
4.1.2.	Die sauerstoffabhängige Bildung der Glykolsäure (Reaktion "B")	88
4.1.3.	Abhängigkeit der Reaktionen "A" und "B" vom CO_2 -Angebot	89
4.2.	Die Kohlenstoffquellen der Reaktionen "A" und "B"	91
4.2.1.	Die Radioaktivitätsverteilung in den Kohlenstoffatomen der Glykolsäure nach kurzzeitiger $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung	91

2.5.	Aktivierter Glykolaldehyd und Ribulose-1,5-diphosphat als Kohlenstoffquellen der oxidativen Glykolatsynthese in isolierten Chloroplasten	95
4.3.	Die Oxidanten in der Glykolatsynthese	103
5.	Zusammenfassung	108
6.	Anhang	
	Versuche zur Erklärung der Optimumskurve der Gesamtfixierung von ^{14}C bei stufenweiser Erhöhung der O_2 -Konzentration	112
7.	Literaturverzeichnis	119

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DH	Dehydrogenase
DP	Diphosphat
dpm	Zerfallsrate
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Fd	Ferredoxin
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
F-6-P	Fructose-6-Phosphat
Gluc-6-P	Glucose-6-Phosphat
NADP = TPN	Nicotinamid-adenin-dinucleotid- phosphat
NADPH ₂ = TPNH	reduziertes NADP
P-Glykolat	Phosphoglykolat
3-PGS	3-Phosphoglycerinsäure
R-5-P	Ribose-5-Phosphat
RuDP	Ribulose-1,5-diphosphat
S-7-P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SDP	Sedoheptulose-1,7-diphosphat
ThPP	Thiaminpyrophosphat

1. Einleitung

Glykolsäure ($\text{CH}_2\text{OH} - \text{COOH}$) ist eine im Pflanzenreich häufig und oft in großer Menge auftretende Verbindung, die sowohl bei der Photosynthese in Algen und Landpflanzen (8, 13, 61, 79, 86, 90, 93), als auch nach Photosyntheseexperimenten mit isolierten Chloroplasten nachgewiesen werden kann (3, 16, 26, 82). So geben beispielsweise WARBURG und KRIPPAHL (86) 1960 an, daß 92 % des von der Grünalge *Chlorella* unter Sauerstoff photosynthetisch aufgenommenen Kohlenstoffs in Glykolsäure eingebaut wurden.

Trotz des häufigen Vorkommens bestehen über die Biosynthese der Glykolsäure noch viele Unklarheiten, doch ist bekannt, daß sie sowohl reduktiv als auch oxidativ gebildet werden kann und daß ihre Synthese durch niedrigen CO_2 -Partialdruck (19, 86), hohen O_2 -Partialdruck (8) und hohe Lichtintensitäten (30, 95) gefördert wird.

Die wichtigsten Vorstellungen der Biogenese von Glykolsäure sollen zunächst kurz dargelegt werden.

1. Bildung von Glykolsäure auf reduktivem Wege

1.1. Kondensation aus zwei Molekülen Kohlendioxid

Sowohl WARBURG, als auch ZELITCH oder STILLER (86, 94, 74) postulierten aufgrund ihrer Versuche mit

Grünalgen und Tabakblättern eine direkte Kondensation von zwei Molekülen CO_2 mit nachfolgender Reduktion zu Glykolat. Die von ihnen beschriebene stöchiometrische Beziehung konnte bisher jedoch nicht von anderen Autoren bestätigt werden, und ZELITCH selbst scheint neuerdings diesem Reaktionsweg keine allzu große Bedeutung mehr beizumessen (95, 96).

1.2. Bildung aus Glyoxylsäure

Die Reduktion von Glyoxylsäure mit Hilfe einer α -Hydroxysäure-Dehydrogenase liefert Glykolsäure. Glyoxylsäure entsteht an verschiedenen Stellen im pflanzlichen Stoffwechsel, wie z.B. in den Peroxisomen aus Glykolat. Nach Ansicht von RANDALL und TOLBERT (65) könnte dieses Glyoxylat in die Chloroplasten zurückkehren und dort Reduktionsäquivalente mit Hilfe der Glyoxylat-Reduktase (80) aufnehmen. Diese Reduktionsäquivalente würden dann in der Glykolsäure-Oxidase-Reaktion vernichtet. Der Sinn eines solchen Glykolsäure-Glyoxylsäure-Shuttles (47, 77) wird in der Vernichtung überschüssiger Reduktionsäquivalente zu H_2O_2 und dann (in der Katalase-Reaktion) zu $\text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$ gesehen.

Außerdem kann Glyoxylat auch außerhalb der Chloroplasten zu Glykolat reduziert werden. Bei der Keimung fettreicher Samen wird nämlich im Glyoxylsäurezyklus Glyoxylat gebildet, das mit Hilfe der Glyoxylat-Reduktase teilweise zu Glykolsäure reduziert wird (69).

Auch in der Isocitratlyase-Reaktion kann Glyoxylat entstehen, wenn Grünalgen auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gezogen werden. Dies konnte durch Verfütterung von radioaktiv markiertem Acetat, z.B. an Chlorella, wahrscheinlich gemacht werden, wo als eines der ersten Assimilationsprodukte ^{14}C -markierte Glykolsäure auftrat (34, 35). Da bei diesen Versuchen kein freies Glyoxylat nachweisbar war, müßte Glyoxylsäure also sofort mit Hilfe der Reduktase reduziert werden. Ob dieser Weg der Glykolatbildung jedoch auch bei höheren Pflanzen existiert, ist unsicher, da bisher in grünen Geweben Isocitratlyase noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

2. Bildung von Glykolsäure auf oxidativem Wege

2.1. Entstehung aus Zuckerphosphaten

Daß Glykolsäure im Zusammenhang mit der photosynthetischen CO_2 -Fixierung entstehen kann, fanden bereits CALVIN et al. (19) bei ihren ersten Isotopenversuchen. 1960 versuchten BRADBEER und ANDERSON (16) durch Applikation verschiedener ^{14}C -markierter Verbindungen an isolierte Chloroplasten die Kohlenstoffquelle für das im Zusammenhang mit der Photosynthese in diesen Organellen synthetisierte Glykolat zu finden. Der Einbau war jedoch unspezifisch, und die ^{14}C -Einbauprodukte wurden durch die damals noch nicht bekannte verschiedene

Permeabilität der (inneren) Chloroplastenmembran z.B. für verschiedene Zuckerphosphate (9) drastisch verfälscht. Gleichwohl ergaben sich aber sowohl durch die erstgenannten, als auch durch die Untersuchungen von BRADBEER und ANDERSON (16) die Vorstellungen, daß Zuckerphosphate die unmittelbaren Vorläuferverbindungen von Glykolat seien.

Eines der im Chloroplasten gebildeten Zuckerphosphate, nämlich Ribulose-1,5-diphosphat, erscheint aufgrund verschiedener Befunde als Vorläuferverbindung am wahrscheinlichsten.

Nach Angaben von KAUSS und KANDLER (46) kann RuDP bereits durch die Einwirkung von Luftsauerstoff ohne die Mitwirkung eines Enzyms oxidativ gespalten werden. Dabei entstehen neben einer Reihe anderer Zerfallsprodukte auch 3-Phosphoglycerinsäure und Phosphoglykolat.

OGREN und BOWES (63) untersuchten nun die Bildung von Glykolsäure aus RuDP in Chloroplastenextrakten der Sojabohne. Dabei stellten sie fest, daß RuDP in Anwesenheit von RuDP-Carboxylase zu P-Glykolat und 3-PGS gespalten wird. Das entstehende P-Glykolat wird weiterhin mit Hilfe einer P-Glykolat-Phosphatase dephosphoryliert. Diese Phosphatase ist ein Enzym, das in hohen Aktivitäten bereits in einer Reihe von Pflanzen nachgewiesen werden konnte (1, 15, 57, 66). ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57) haben

die enzymatische Spaltung von RuDP näher untersucht und dabei die Oxygenase-Aktivität der RuDP-Carboxylase beschrieben. Die sogenannte RuDP-Oxygenase-Reaktion, bei der RuDP zu 3-PGS und P-Glykolat gespalten wird, soll in Konkurrenz zu der seit langem bekannten Carboxylierungsreaktion treten, bei der aus RuDP und CO_2 zwei Moleküle 3-PGS entstehen. Die Autoren fanden bei ihren Enzymversuchen, daß die RuDP-Oxygenase ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 8,5 - 9,6 hat, während die Carboxylase ihr Wirkungsoptimum im Bereich von pH 7,5 - 8,5 erreicht. Die RuDP-Oxygenase ließ selbst in reiner Sauerstoffatmosphäre (1 at O_2) noch keine Sättigung des Enzyms erkennen (vgl. auch LATZKO und KELLY (54)).

Eine Reihe von In-vivo-Befunden (51, 52) läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß der RuDP-Oxygenase-Reaktion auch in vivo eine Bedeutung bei der Glykolatbildung zukommt.

SHAIN und GIBBS (70) nehmen andererseits an, daß Glykolsäure durch Oxidation des aktivierten Glykolaldehyds entsteht. Die Versuche wurden mit osmotisch aufgebrochenen Spinatchloroplasten durchgeführt, denen neben F-6-P, Transketolase und ThPP auch Ferredoxin zugesetzt worden war. Letzteres begünstigt offensichtlich die Photoreduktion von O_2 zu H_2O_2 , denn durch Katalase-

zusatz konnte die Glykolatbildung signifikant gehemmt werden. Allerdings ließ sich stets ein nicht hemmbarer Anteil der Glykolatsynthese aus F-6-P feststellen, der nach Meinung der Autoren auf die Wirkung eines in der Lichtreaktion II entstehenden unbekannten Oxidanten zurückzuführen sei. Bei der Bildung von Glykolsäure aus dem aktivierten Glykolaldehyd wäre jedoch die vorhin genannte P-Glykolat-Phosphatase (1, 15, 57, 66) überflüssig.

2.2. Bedeutung des Oxidanten

Es stehen sich in der Literatur also zumindest zwei verschiedene Ansichten über die Kopplung von Photosynthese und Glykolatbildung gegenüber:

Erstens die Meinung, daß das Substrat der Glykolatsynthese RuDP und der Oxidant molekularer Sauerstoff selbst ist und daß die Bildung der Glykolsäure enzymatisch geschieht. Die physiologischen Befunde, daß niedriges CO_2 -Angebot und hoher O_2 -Partialdruck die Glykolatsynthese stimulieren, lassen sich dabei durch die Konkurrenz von CO_2 und O_2 um das an RuDP-Carboxylase bzw. RuDP-Oxygenase gebundene RuDP erklären.

Inwieweit eine verstärkte RuDP-Oxygenase-Reaktion mit hoher Lichtintensität korreliert werden kann, ist fraglich. Die Erklärung von TOLBERT (76), daß eine hohe Lichtintensität eine drastische Alkalisierung des Stromas und damit eine pH-Verschiebung zugunsten der RuDP-Oxygenase-Reaktion und zuungunsten

der RuDP-Carboxylase-Reaktion zur Folge habe, befriedigt nicht ganz, da der von HELDT und WERDAN (41) bestimmte pH-Wert des Stromas 8,2 nicht überschreitet.

Die von der Schule von GIBBS (30, 31, 70) und von WHITTINGHAM (88) vertretene Auffassung betrachtet die Glykolatsynthese selbst als nicht enzymatischen Prozeß, wobei zumindest die Förderung durch hohe Lichtintensität, hohen O_2 -Partialdruck und niedriges CO_2 -Angebot leicht dadurch erklärt werden kann, daß man dem photosynthetisch erzeugten H_2O_2 die Rolle des Oxidanten zuschreibt. Daß H_2O_2 tatsächlich beim photosynthetischen Elektronentransport entsteht, konnten kürzlich PATTERSON und MYERS (64) bei In-vivo-Versuchen mit *Anacystis nidulans* zeigen. Es leuchtet ein, daß bei mangelndem CO_2 -Angebot und hoher Lichtintensität der Elektronentransport zum Sauerstoff (die sogenannte Mehler-Reaktion) (58, 59, 60, 87) begünstigt wird und daß ein hoher O_2 -Partialdruck in der gleichen Richtung wirkt.

Die physiologischen Befunde der Glykolatsynthese lassen sich also mit der GIBBS'schen Vorstellung etwas befriedigender erklären als mit der RuDP-Carboxylase-Reaktion allein. Ob allerdings nur aktivierter Glykolaldehyd von H_2O_2 oxidiert werden kann und nicht auch ein anderes Zuckerphosphat, bleibt fraglich.

3. Aufgabenstellung

Den vorhin erwähnten Arbeiten von WHITTINGHAM et al. (88, 89) und GIBBS (30, 31, 70) lassen sich zwei für die vorliegende Arbeit wichtige Aussagen entnehmen:

Zwar besteht eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen dem Sauerstoffgehalt der angebotenen Atmosphäre und dem Anteil an frisch fixiertem Kohlenstoff, der in Form von Glykolat auftritt, aber dennoch ist bei Verwendung von N_2 als Atmosphäre der prozentuale Anteil der Glykolsäure nie Null, sondern es findet sich immer ein Restanteil von mindestens 5 % des gesamtfixierten Radiokohlenstoffs in Glykolat. Es liegt nun nahe, diesen Befund dahingehend zu erklären, daß die bei WHITTINGHAM et al. (89) und GIBBS (29, 70) angegebene Konzentrationsangabe " 0 % O_2 " lediglich einen nicht gemessenen Sauerstoffgehalt bedeutet, da zwar die Algen- oder Chloroplastensuspension zu Beginn des Experiments mit Stickstoff durchspült wurde, aber dem photosynthetisch laufend produzierten Sauerstoff nicht Rechnung getragen wurde. Es bleibt deshalb offen, ob bei wirklich anaeroben Bedingungen Glykolat gebildet wird.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich die lineare Abhängigkeit der Glykolatproduktion vom O_2 -Partialdruck des Mediums auch bei den bisher nicht näher bestimmten niedrigen Sauerstoffkonzentrationen

trationen ergibt. Würde dies zutreffen, so müßte man darin einen Hinweis darauf sehen, daß die Glykolatproduktion im Chloroplasten nur eine, wohl nicht enzymatischen Reaktion zugeschrieben werden kann. Wäre dies nicht der Fall, so müßte man davon ausgehen, daß es im Chloroplasten mehrere zur Glykolatbildung führende Wege geben kann, wie es SHAIN und GIBBS (70) für rekonstituierte Chloroplasten postuliert haben.

Die Versuche sollten zunächst bei sättigender CO_2 -Konzentration durchgeführt werden, da nicht bekannt war, ob die bei mangelndem CO_2 -Angebot auftretenden höheren prozentualen Anteile der Glykolsäure am fixierten Kohlenstoff auf zusätzliche, die Beobachtung komplizierende Synthesewege zurückzuführen sind.

Danach sollte geklärt werden, wie das CO_2 -Angebot die Bildung der Glykolsäure bei unterschiedlichen, definierten O_2 -Partialdrücken beeinflußt. Diese Versuche sollten mit isolierten intakten Chloroplasten durchgeführt werden, da ausschließlich die "photosynthetische" Glykolsäuresynthese untersucht werden sollte.

Weiterhin sollten Hinweise auf die chemische Natur der Kohlenstoffquelle, also der unmittelbaren Vorläuferverbindung der Glykolsäure im Chloroplasten gesammelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Für sämtliche Untersuchungen, bei denen isolierte Chloroplasten benötigt wurden, verwendeten wir junge, kräftige Spinatblätter (*Spinacia oleracea* L. Vital R.). Der im Gewächshaus oder im Freiland gezogene Spinat wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn geerntet.

2.2. Isolierung intakter Spinatchloroplasten

50 g gewaschene, entrippte und geschnittene Spinatblätter wurden mit 100 ml teilweise gefrorenem "Grinding-Medium" (23) (s. 2.16.) versetzt und 5 sec lang mit einem Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde durch sechs Lagen Verbandmull filtriert und bei 2000 g eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit wenig "Puffer B" (45) (s. 2.16.) aufgenommen. Durch anschließende einminütige Zentrifugation bei 30 g (11, 40) wurden ganze Zellen und gröbere Partikel abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die intakten Chloroplasten bei 1000 g abzentrifugiert (1 min).

Alle Arbeiten wurden bei 0 °C durchgeführt.

Untersuchungen der Chloroplastensuspension unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigten, daß nahezu keine Chloroplastenfragmente oder sonstige Verunreinigungen vorlagen. Demnach handelte es sich um Class I chloroplasts nach SPENCER und UNT (72) oder nach der Klassifizierung von HALL um Type A chloroplasts (37). Die Bestimmung der Menge an Chlorophyll erfolgte nach Extraktion mit Aceton in einem Spektralphotometer (Beckman LV 1193, Monochromator DU) nach ARNON (2).

2.5. Untersuchung des bei der Isolierung intakter Grünalgenchloroplasten entfallenden Anteils an "broken chloroplasts"

Mit Hilfe der ferricyanidabhängigen Hill-Reaktion intakter und osmotisch geschockter Chloroplasten läßt sich der prozentuale Anteil der "broken chloroplasts" in der "intakten Präparation" ermitteln (39). Das Ferricyanid kann nur bei beschädigten Chloroplasten als Elektronenakzeptor fungieren, weil es offensichtlich die Membranen intakter Chloroplasten nicht zu durchdringen vermag.

Der Vergleich der ferricyanidabhängigen Sauerstoffproduktion intakter und osmotisch aufgebrochener Chloroplasten wurde in zwei verschiedenen Ansätzen

durchgeführt:

1. Durch Vergleich intakter und osmotisch aufgebrochener Chloroplasten, letztere in hypotonischem Medium und
2. Durch Vergleich intakter und osmotisch aufgebrochener Chloroplasten, die wieder in isosmotischem Medium suspendiert waren.

Im ersten Ansatz wurden in die Küvette eines Oxiographen (s. 2.5., 2.6.) pipettiert:

- a) 0,07 ml einer Suspension von intakten Chloroplasten (etwa 150 μg Chlorophyll/ml)

1,5 ml "Puffer C" (45)

Nachdem die Küvette O_2 -frei gespült war, wurde mit 100 000 Lux belichtet, 0,01 ml Ferricyanid (1,25 mmolar) zugesetzt und die Rate der O_2 -Produktion bestimmt.

- b) 0,07 ml einer Suspension von intakten Chloroplasten (etwa 150 μg Chlorophyll/ml)

0,08 ml "Puffer C" (45)

Dann wurden die Chloroplasten durch Zusatz von 1,5 ml dest. Wasser aufgebrochen; die Suspension wurde mit Stickstoff O_2 -frei gespült und wie oben beschrieben belichtet; anschließend wurden 0,01 ml Ferricyanid (1,25 mmolar) zugegeben und die Rate der O_2 -Produktion bestimmt.

Beim zweiten Ansatz wurde den osmotisch aufgebrochenen Chloroplasten nach einer Wartezeit von einer Minute so viel fester Sorbit zugesetzt, bis die

Tab.1: Bestimmung des Anteils an "broken chloroplasts" in einer
Präparation isolierter intakter Spinachchloroplasten

		Rate der O ₂ -Produktion [µM O ₂ /mg Chl. x Std.]	Anteil intakter Chloroplasten [%]
1. Versuch	ungeschockte Chloroplasten	3,70	94,2
	osmot. geschockte Chloroplasten	63,30	0,0
2. Versuch	ungeschockte Chloroplasten	6,25	92,9
	osmot. geschockte Chloroplasten (+ Sorbit)	87,60	0,0

ursprüngliche Osmolarität (0,33 molar) der Suspension wieder hergestellt war.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind der Tab.1 zu entnehmen.

Die Daten zeigen, daß frisch isolierte Chloroplasten mit Ferricyanid als Hill-Akzeptor praktisch nicht reagieren können, also nahezu vollständig intakt sind. Die beim 2. Versuch erhöhte Rate der O_2 -Produktion der "intakten" Chloroplasten zeigt, daß der Anteil an "broken chloroplasts" mit der Zeit etwas zunimmt. Im allgemeinen darf man jedoch annehmen, daß die Versuchsergebnisse nicht durch das Vorhandensein eines größeren Prozentsatzes an "broken chloroplasts" verfälscht wurden.

2.4. Präparation osmotisch aufgebrochener Chloroplasten zur Ermittlung des biogenetischen Vorläufers der Glykolsäure

Die Chloroplasten wurden - wie unter 2.2. beschrieben - isoliert und dann osmotisch aufgebrochen, indem sie nach dem letzten Zentrifugieren mit sorbitfreiem "Puffer C" (45) (s. 2.16.) versetzt und die Membranen nach drei Minuten bei 6000 g abzentrifugiert wurden. Dem Überstand wurde DTE mit einer Endkonzentration von 0,3 mM und so viel fester Sorbit zugegeben, bis die anfängliche Osmolarität der Lösung von 0,33 molar wieder erreicht war.

Der Niederschlag wurde in 1 ml "Puffer B" (45) suspendiert; 4/5 dieser Suspension wurden zur löslichen Fraktion gegeben und der Chlorophyllgehalt auf 150 µg/ml eingestellt.

2.5. Versuchsaufbau am Oxigraphen

Zu Photosyntheseversuchen bei definierten O_2 -Partialdrücken wurde die in Fig.1 dargestellte Anordnung verwendet.

Die Chloroplastensuspension befindet sich in der thermostatisierten (20 °C) Küvette eines Oxigraphen (Gilson-Oxigraph K - IC), in die seitlich eine Clark-Elektrode eingesetzt ist, die selektiv den Sauerstoffgehalt der Suspension mißt und die Werte über einen Schreiber registriert. Vor jedem Versuch wurden die Elektroden mit luftgesättigtem Wasser (0,2673 µMol O_2 /ml bei 20 °C) geeicht.

Auf die Küvette wird ein T-Stück aufgesetzt, dessen anderes Ende mit einem Gummiseptum verschlossen ist. Durch dieses Septum können mittels Injektionsspritzen Lösungen eingespritzt oder Proben entnommen werden, ohne daß exogener Sauerstoff eindringen kann. Auf den Fuß des T-Stückes ist ein 1 m langes Rohr aufgesetzt, durch das über das T-Stück zwei dünne Teflonschläuche in die Küvette führen (in Fig.1 ist wegen der Übersichtlichkeit nur ein Teflonschlauch abgebildet).

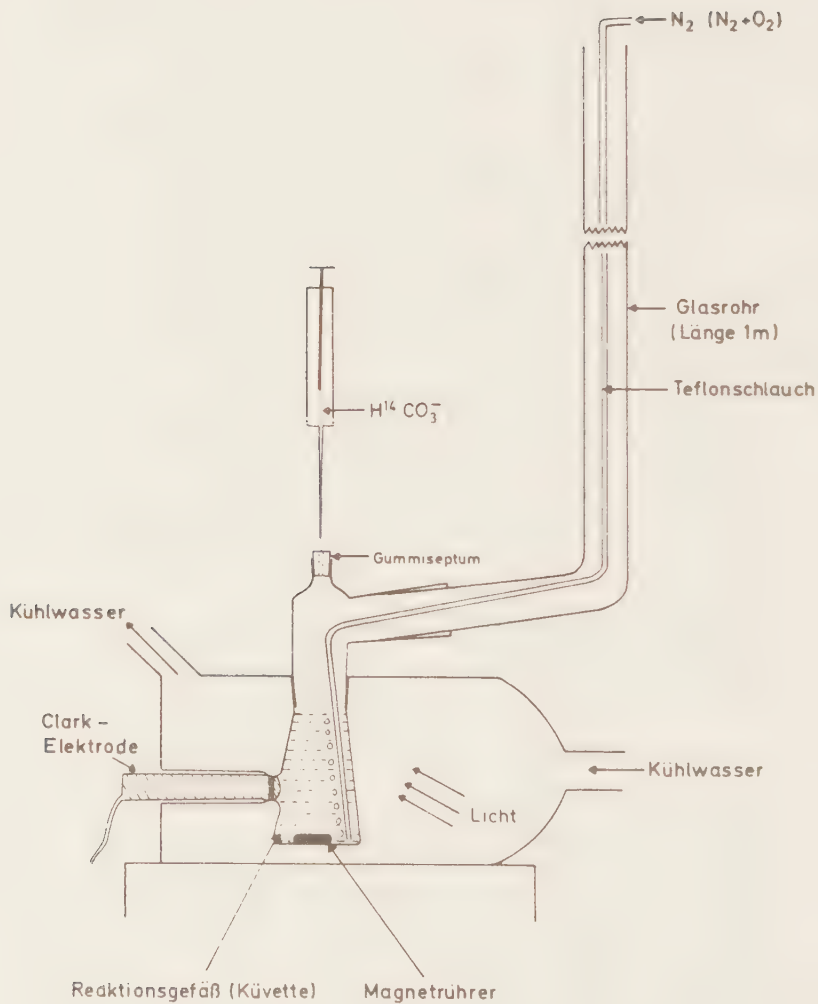


Fig.1: Versuchsanordnung zur Photosynthese mit intakten Spinachchloroplasten bei definierten Sauerstoffpartialdrücken

Spült man die Küvette über einen Schlauch mit Stickstoff, so wird einmal der Sauerstoff aus dem Medium herausgespült, zum anderen baut sich im Rohr eine Stickstoffsäule auf, die ein Hineindiffundieren von Luftsauerstoff in die Küvette verhindert.

Durch den zweiten Teflonschlauch kann zusätzlich Sauerstoff eingeleitet werden, so daß sich das Medium mit Sauerstoff anreichert. Mit dieser Versuchsanordnung lassen sich genau definierbare und reproduzierbare O_2 -Partialdrücke einstellen.

Die Küvette selbst kann verdunkelt oder mit beliebiger Lichtstärke belichtet werden. Als Lichtquelle dienten entweder ein Diaprojektor mit einer 500-W-Lampe oder eine 300-W-Astraluxlampe.

2.6. Vorbereitung des Oxigraphen

2.6.1. Versuchsgang

In die Küvette des Oxigraphen wurden 1,6 ml "Puffer C" (45) (s. 2.16.) gegeben und mit Stickstoff O_2 -frei gespült (1. Abfall der O_2 -Konzentration in Fig.2).

Anschließend wurde so viel der Chloroplastensuspension zugegeben, daß die Chlorophyllkonzentration 150 $\mu\text{g/ml}$ betrug. Der miteingebrachte Sauerstoff wurde wieder mit Stickstoff herausgespült (2. Abfall der O_2 -Konzentration in Fig.2). Um Photosynthese auszuschließen, wurde die Küvette während dieser Zeit

verdunkelt.

Sobald die Suspension wieder O_2 -frei war, wurde so viel Bikarbonatlösung durch das Gummiseptum eingespritzt, daß die Konzentration 7,9 mM/l betrug. Dann wurde die Küvette mit ca. 100 000 Lux beleuchtet, wobei weiterhin mit Stickstoff gespült wurde.

Die CO_2 -Fixierung und damit verbunden die Sauerstoffproduktion kommen nach einer lag-Phase von wenigen Minuten in Gang, bleiben einige Zeit konstant und nehmen dann langsam wieder ab (s. Fig.2).

Bedingt durch das gleichmäßige Ausblasen des produzierten Sauerstoffs mit Stickstoff stellt sich während der linearen Phase der O_2 -Produktionsrate ein konstanter O_2 -Partialdruck in der Suspension ein, der in einem Plateau der Schreiberkurve zum Ausdruck kommt (Fig.2). Aus der Lage des Plateaus läßt sich damit die O_2 -Konzentration bestimmen.

Durch verschieden starkes Spülen mit Stickstoff läßt sich die Höhe dieses Plateaus, also der über einige Minuten konstante O_2 -Partialdruck, in der Suspension verändern.

Auch durch exogen zugeführten Sauerstoff läßt sich dieses Plateau variieren, so daß beliebige O_2 -Partialdrücke eingestellt werden können.

Sobald ein konstanter O_2 -Partialdruck in der Suspension erreicht war, wurde durch das Septum eine Lösung von radioaktivem Bikarbonat oder Karbonat eingespritzt.

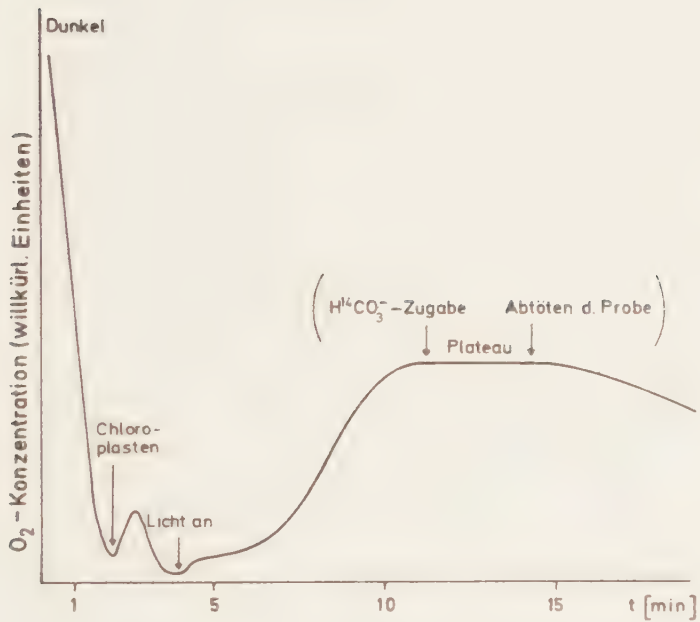


Fig.2: Sauerstoffkonzentration in der Küvette eines Oxigraphen während des Versuches

Nach einer Reaktionszeit von drei Minuten wurde die Suspension entnommen und durch Einspritzen in ein gleiches Volumen eines heißen Methanol-Ameisensäure-Gemisches (5 % Ameisensäure in Methanol) abgetötet.

2.6.2. Deutung des entstandenen Kurvenbildes

Die Versuche mit isolierten, intakten Spinatchloroplasten wurden bei definierten, künstlich eingestellten Sauerstoffpartialdrücken durchgeführt, so daß eine laufende Kontrolle durch Verfolgung der O_2 -Produktion der Chloroplasten nicht möglich war.

Um die Eigenproduktion an Sauerstoff zu bestimmen, wurde nach Zugabe von Bikarbonat zur Chloroplastensuspension der gebildete Sauerstoff nicht mit Stickstoff aus der Suspension herausgespült. Es zeigte sich (s. Fig.2), daß nach einer lag-Phase von etwa 2 Minuten die Chloroplasten etwa 6-7 Minuten lang mit gleichbleibender Rate ($10,6 \mu\text{Mol } O_2/\text{mg Chlorophyll} \times \text{Stunde}$) Sauerstoff bis zu einer Konzentration von $680 \mu\text{M } O_2/\text{l}$ bilden.

Die in 2.6.1. angegebene Schreiberkurve (Fig.2) des Oxigraphen zeigt, daß die O_2 -Produktion erst nach etwa 2-3 Minuten einen maximalen Wert erreicht. WALKER et al. (83, 84) deuten diese lag-Phase dahingehend, daß die Stoffwechselprodukte, die durch die Photosynthese gebildet werden, erst eine be-

stimmte Konzentration erreichen müssen, bevor maximale Photosyntheseraten möglich sind.

Dieser Befund konnte bestätigt werden, denn unmittelbar nach Zugabe von β -PGS zur Chloroplastensuspension setzte die O_2 -Produktion mit maximaler Rate ein.

JENNINGS und FORTI (44) sind der Meinung, daß der Elektronentransport während der lag-Phase normal abläuft. Das bedeutet, daß unter Umständen während dieser Zeit die O_2 -Reduktion in der Mehler-Reaktion (59, 60) begünstigt werden müßte. FORTI stützt seine Annahme auf den Befund, daß O_2 in diesem Fall die ATP-Bildung stimulieren kann und daß damit die lag-Phase letztlich von der Menge an vorhandenem ATP abhängt. Auch diese Ansicht ist nicht unwahrscheinlich, da höhere O_2 -Partialdrücke (etwa 100 μ molar) die lag-Phase verkürzen.

Die in 2.6.1. angegebene Schreiberkurve (Fig.2) fällt nach dem 3-4minütigen Plateau des Sauerstoff-Partialdruckes schwach ab. Dieser Befund kann folgendermaßen erklärt werden:

Die Chloroplasten werden durch photooxidative ($0,9 - 1 \times 10^5$ Lux) Prozesse und durch Alterungsvorgänge geschädigt. Durch das gleichbleibende Austreiben des gebildeten O_2 mit Stickstoff und abnehmende O_2 -Produktion der Chloroplasten erniedrigt sich dann die Konzentration an Sauerstoff in der Suspension.

2.7. Aufarbeitung der Proben

Die mit Methanol-Ameisensäure abgetöteten Proben wurden anschließend 10 Minuten bei 80 °C erhitzt, um nicht fixiertes $^{14}\text{CO}_2$ auszutreiben.

Durch Zentrifugation, anschließende Konzentration des Überstandes am Rotationsverdampfer und erneute Zentrifugation wurde Lösliches von Unlöslichem getrennt. In einem aliquoten Teil des klaren Überstandes sowie des Unlöslichen wurde der Einbau von ^{14}C im Szintillationszähler gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde die Gesamtfixierung von $^{14}\text{C}/\text{mg}$ Chlorophyll x Stunde berechnet.

Ein weiterer Teil des Extraktes wurde papierchromatographisch aufgetrennt, und mit dem Rest wurde der prozentuale Anteil der Glykolsäure am insgesamt assimilierten Radiokohlenstoff durch Ionenaustauscherchromatographie bestimmt.

2.8. Trennverfahren

2.8.1. Papierchromatographie

Chromatographiert wurde zweidimensional auf Whatmanpapier Nr. I bei 25 °C. Waren größere Substanzmengen aufzutrennen, wurde Whatmanpapier Nr. III verwendet.

Als Fließmittelgemische wurden benützt:

1. n-Butanol-Wasser (Lösung 1) : Propionsäure-Wasser
(Lösung 2) = 1 : 1

Lösung 1: n-Butanol : Wasser = 750 : 50 (v/v)

Lösung 2: Propionsäure : Wasser = 352 : 448 (v/v)

2. 88 % (w/w) Phenol : Wasser : Eisessig : 1 m Na₂ EDTA
= 480 : 160 : 10 : 1 (v/v)

3. n-Butanol : Pyridin : Wasser : Eisessig
= 60 : 40 : 30 : 3 (v/v)

4. n-Butanol : Propionsäure : Wasser
= 10 : 5 : 7 (v/v)

Für die zweidimensionale Chromatographie wurden die
Fließmittelgemische zu folgenden Systemen kombiniert:

System I : 1 + 2

System II : 1 + 3

System III : 2 + 3

Nach der papierchromatographischen Auftrennung wurden die getrockneten Chromatogramme mit 0,01 n äthanolischer NaOH besprüht, um die flüchtige Glykolsäure in ihr nichtflüchtiges Salz zu überführen.

2.8.2. Hochspannungselektrophorese

Die Identifizierung oder Reinigung von Substanzen, die für die Applikation von verschiedenen Zuckerphosphaten an ein rekonstituiertes Chloroplasten-

system (s. 2.15.6.) benötigt wurden, erfolgte z.T. durch Hochspannungselektrophorese in 0,2 m Ammoniumformiat-Puffer (43) pH 3,7 bei 27 V/cm und 8 °C während 90-100 Minuten. Zur Papierelektrophorese wurden die zu untersuchenden Substanzen oder Substanzgemische in wenig Puffer aufgenommen und auf das mit Puffer gleichmäßig befeuchtete Papier punkt- oder strichförmig aufgetragen.

Die Pherogramme wurden mit Whatmanpapier Nr. I und bei größeren Substanzmengen mit Whatmanpapier Nr. III hergestellt. Außerdem verwendeten wir die Hochspannungselektrophorese, um eine bessere Auftrennung der Zuckermono- und -diphosphate in den Chloroplastenextrakten zu erzielen. In diesem Fall wurde die Hochspannungselektrophorese mit der Papierchromatographie (Fließmittel 1, zweimalige Entwicklung) kombiniert.

2.8.3. Säulenchromatographische Auftrennung des Chloroplastenextraktes

Gemäß der Vorschrift von ZELITCH (92, 94) wurde Dowex 1 x 8 100-200 mesh in die Acetatform überführt. Die Säulenchromatographie wurde an einer Ionenaustauschersäule von 0,7 cm Ø und einer Höhe von 20-21 cm durchgeführt; dies entspricht einem Volumen von etwa 8 ml. Nach dem Auftragen von 1 ml Extrakt wurden die nichtadsorbierten Verbindungen



Fig. 1: Säulenchromatographische Auftrennung eines Chloroplastenextraktes an einer Dowex 1 x 8 - Säule

X—X: Radioaktivitätsbestimmung
 O—O: Kolorimetrische Bestimmung der Glykolsäure
 —: Titrationswerte des linearen Essigsäuregradienten (Verbrauch an 0,1 n NaOH)
 - - -: Titrationswerte des linearen Essigsäuregradienten (Verbrauch an 0,1 n NaOH)

mit Wasser ausgewaschen, dann wurde die Säule unter Verwendung eines linearen Wasser-Essigsäuregradienten (30 ml Wasser - 40 ml 5,5 n Essigsäure) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 0,6 ml aufgefangen.

In der Regel wurde nur die Radioaktivität des Eluates bestimmt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde stichprobenhaft authentische Glykolsäure dem Extrakt zugemischt und im Eluat kolorimetrisch bestimmt (56) (s. 2.9.).

Ein typisches Elutionsdiagramm zeigt Fig.3 .

2.9. Kolorimetrische Bestimmung und Identifizierung der bei der Säulenchromatographie erhaltenen Glykolsäure

Um beim Identitätsnachweis bei der kolorimetrischen Glykolatbestimmung deutliche Extinktionsänderungen feststellen zu können, wurde dem mit Hilfe der Säulenchromatographie aufzutrennenden Extrakt 1 ml einer wäßrigen Lösung zugesetzt, die 0,42 mg authentische, nicht radioaktive Glykolsäure enthielt. Anschließend wurde die Säule - wie unter 2.8.3. beschrieben - eluiert.

Daraufhin wurden gemäß der Vorschrift von LEWIS und WEINHOUSE (56) 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung mit 0,2 ml einer 0,01prozentigen Lösung

von 2,7-Dihydroxynaphthalin in konzentrierter Schwefelsäure im Eisbad versetzt.

Nach dem Mischen und Abkühlen wurde die Lösung 20 Minuten im Wasserbad auf 100 °C erhitzt und anschließend wieder im Eisbad abgekühlt. Sodann wurde mit 4 ml 2 n H_2SO_4 verdünnt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 530 nm im Spektralphotometer.

2.10. Überprüfung der säulenchromatographischen Glykolsäureisolierung hinsichtlich Ausbeute und Reinheit

2.10.1. Ausbeute

Der einzige Hinweis auf die Höhe der Ausbeute bei der säulenchromatographischen Isolierung der Glykolsäure ist in einer Arbeit von ROBINSON und GIBBS (67) enthalten. Die Autoren konnten mit Hilfe eines Stufengradienten im photometrischen Test nach der Methode von CHALKINS (20) zwischen 90 und 98 % der eingesetzten Glykolsäure nachweisen.

Da wir aber zur Auftrennung der Substanzen einen stufenlosen, linearen Gradienten wählten (s. 2.8.3.), mußte die Ausbeute bestimmt werden. Dazu wurde eine Suspension isolierter intakter Spinatchloroplasten mit einer genau definierten Menge an radioaktiv markierter Glykolsäure versetzt und dann in der be-

schriebenen Weise aufgearbeitet. Die Ausbeuten an Glykolsäure lagen stets zwischen 98 und 100 %, wobei die Radioaktivität in 14 Fraktionen zu je 0,6 ml enthalten war.

2.10.2. Reinheit der säulenchromatographisch isolierten Glykolsäure

ZELITCH (92, 94) zeigte, daß Glykolsäure und Glycerinsäure bei Elution mit einem Stufengradienten (4 n Essigsäure) in denselben Fraktionen enthalten sind. Um nun zu überprüfen, ob eine Trennung von Glykolsäure und Glycerinsäure mit einem stufenlosen, linearen Gradienten möglich ist (0 - 4,2 n Essigsäure), wurden genau definierte Mengen an radioaktiver Glykolsäure und radioaktiver Glycerinsäure der Chloroplastensuspension zugesetzt. Es ließ sich jedoch auch mit dem stufenlosen Gradienten nur ein Peak erkennen.

In einem weiteren Versuch wurden der Chloroplastensuspension radioaktiv markierte Glycerinsäure und ^{12}C -Glykolsäure appliziert. Fig.4 (73) zeigt, daß Glykolsäure (Nachweis mit Hilfe des Farbtests nach LEWIS und WEINHOUSE (56)) und Glycerinsäure praktisch gemeinsam eluiert werden.

Um festzustellen, ob noch weitere Verunreinigungen der säulenchromatographisch isolierten Glykolsäure

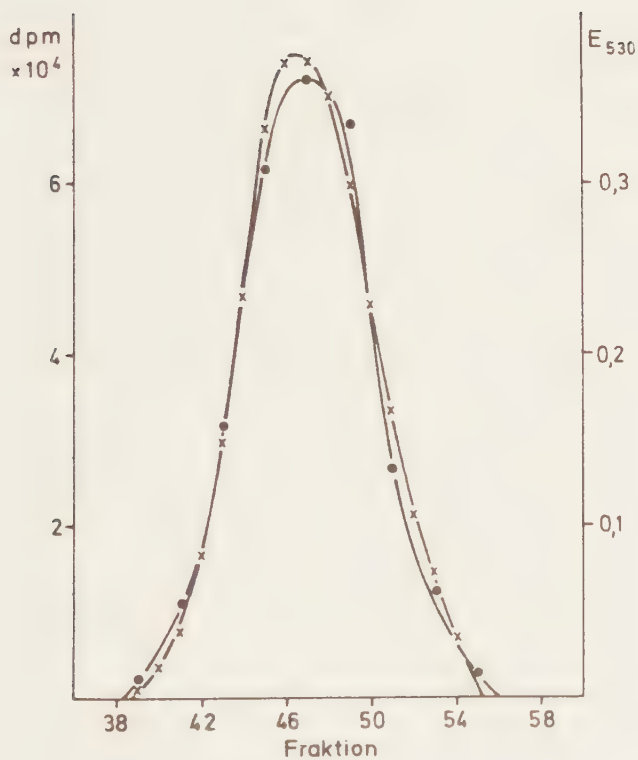


Fig.4: Säulenchromatographische Auftrennung
von Glykolsäure und Glycerinsäure

●—● : Glykolsäure
x—x : Glycerinsäure

vorhanden waren, wurden die glykolsäurehaltigen Fraktionen vereinigt, mit nicht radioaktiver Glykolsäure vermischt und papierchromatographisch (Fließmittelsysteme I, II und III) und -elektrophoretisch untersucht. Neben dem Fleck der Glykolsäure trat nur noch der der radioaktiven Glycerinsäure auf. Eine weitere Verunreinigung konnte somit ausgeschlossen werden.

Bei der Auswertung der Papierchromatogramme ergab sich nun, daß bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen (meist 3 Minuten Fixierung von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) der in der Chloroplastensuspension befindliche prozentuale Anteil an radioaktiv markierter Glycerinsäure maximal 10 % der gebildeten radioaktiven Glykolsäure betrug.

Bei Markierungskinetiken zeigte sich, daß radioaktiv markierte Glycerinsäure erst nach zweiminütiger Photosynthese in $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ nachweisbar ist.

Die Isolierung der Glykolsäure mit Hilfe der Ionenaustauschersäule war also bei den hier beschriebenen Versuchen als Schnelltest (Dauer der Elution: 1,5 - 2 Stunden) zur quantitativen Glykolatbestimmung geeignet, da keine nennenswerten Glycerinsäuremengen zu erwarten waren.

2.11. Lokalisation von Substanzen auf den Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen

Von den Papierchromatogrammen bzw. -pherogrammen wurden Radioautogramme auf Agfa-Gevaert-Roentgenpapier oder bei sehr geringen ^{14}C -Aktivitäten auf Agfa-Roentgenfilm Curix RP hergestellt.

Auf die Chromatogramme wurden jeweils verschiedene Testsubstanzen als Identifizierungshilfe aufgetragen. Sie wurden folgendermaßen sichtbar gemacht:

Zucker wurden durch Besprühen der Chromatogramme mit alkalischem Silbernitrat (81), Aminosäuren mit Ninhydrin (50) lokalisiert.

Organische Säuren wurden durch Besprühen mit einer Lösung von Glucose und Anilin in wassergesättigtem Butanol mit anschließendem Erhitzen der Chromatogramme auf 125°C für 5-10 Minuten sichtbar gemacht.

2.12. Identifizierung einzelner Substanzen auf den Chromatogrammen

Bei der Papierchromatographie läßt sich die Glykolsäure in dem von uns am häufigsten benutzten System I sehr gut von den übrigen Substanzen abtrennen und damit stets eindeutig ansprechen.

Dafür mußte allerdings eine relativ schlechte Auftrennung der einzelnen Zuckermono- und -diphosphate in Kauf genommen werden. Deshalb wurde nur die prozentuale Zusammensetzung der als Zuckermomonophosphat und -diphosphat identifizierten Flecken festgestellt.

In einigen Fällen wurden die als Zuckermono- oder -diphosphat angesprochenen Flecken aus dem Chromatogramm ausgeschnitten, mit Wasser eluiert, eingengt und mit saurer Phosphatase versetzt. Die Reaktionsprodukte wurden papierchromatographisch aufgetrennt (Fließmittelsystem III). In der Tab.2 ist das Ergebnis eines typischen Versuches dargestellt.

2.13. Messung der Radioaktivität

2.13.1. Messung der Radioaktivität gelöster Substanzen

Die Messung der Radioaktivität gelöster Substanzen erfolgte im Szintillationszähler (Beckman LS 250) unter Verwendung eines Cocktails aus 100 g Naphthalin, 7 g Butyl-PBD ⁺⁾ und 1 l Dioxan.

Aus den bei den Szintillationsmessungen erhaltenen Werten (cpm) wurden die Realzerfälle (dpm) mit Hilfe der ESKV-Methode bestimmt (33), da die

⁺⁾ Butyl-PBD: 2-(4'-t-Butylphenyl)-5-(4'-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol

Tab.2: Prozentuale Zusammensetzung der papier-
chromatographisch aufgetrennten Zucker-
mono- und -diphosphate

Ursprüngliche Substanzen	Dephosphorylierte Substanz	Prozentualer Anteil [%]
Monophosphate	Glycerinsäure	53,8
	Fructose	19,0
	Sedoheptulose	11,7
	Glucose	15,5
Zuckerdi- phosphate	Fructose	52,9
	Sedoheptulose	44,7
	Glucose	2,4

einzelnen Proben sehr unterschiedlich gequencht waren.

2.13.2. Messung der Radioaktivität von Substanzen auf Papierchromatogrammen und Papierpherogrammen

Von den Radioautogrammen wurden die Flecken auf die Chromatogramme durchgezeichnet und die Radioaktivität mit einem großflächigen Methandurchflußzählrohr mit Endfenster (Frieeseke und Hoepfner FH 49) bestimmt.

Die Messung der Radioaktivität auf eindimensionalen Chromatogrammen oder Pherogrammen erfolgte mit Hilfe eines Papierstreifenzählers (Frieeseke und Hoepfner FHT 101 C und FHT 780 A).

War die Radioaktivität für eine hinreichend genaue Messung im Proportionalzählrohr zu gering, so wurden die Flecken ausgeschnitten und ihre Radioaktivität unter Verwendung eines Toluol-Cocktails (5 g PPO ⁺) in 1 l Toluol) im Szintillationszähler gemessen.

2.14. Chemischer Abbau von Glykolsäure zur Ermittlung der intramolekularen ¹⁴C-Verteilung

Die nach kurzzeitiger ¹⁴C-Fixierung erhaltene Glykolsäure wurde nach der Methode von SIMON und

⁺) PPO: 2,5-Diphenyl-oxazol

FLOSS (71) abgebaut. Hierbei wird die Glykolsäure im ersten Schritt zu CO_2 und Ameisensäure gespalten; letztere kann dann ebenfalls zu CO_2 oxidiert werden.

Die wäßrige Glykolsäurelösung (0,8 mM + radioaktiv markierte Glykolsäure) wurde mit 5 ml 5prozentiger Schwefelsäure und 20 ml Ammonium-Cer-IV-Sulfatlösung (12,7 g in 15 ml konzentrierter Schwefelsäure + 85 ml H_2O) eine Stunde in der CO_2 -freien Apparatur (71) auf 100°C erhitzt. Das abgespaltene CO_2 wurde durch einen Stickstoffstrom in eine Absorptionsfalle gespült und als BaCO_3 aufgefangen.

Die im Rückstand enthaltene Ameisensäure wurde - in Abwandlung der Methode von SIMON und FLOSS - bei vermindertem Druck abdestilliert und mit Natronlauge neutralisiert (48). Das entstandene Natriumformiat wurde in die oben genannte Apparatur gegeben, mit 2 g Quecksilber-II-acetat und 2 ml Eisessig versetzt und in der CO_2 -freigespülten Apparatur ebenfalls eine Stunde auf 100°C erhitzt. Das entstandene CO_2 wurde wie oben aufgefangen.

Die gebildete Menge an BaCO_3 wurde auf gravimetrischem Wege und durch Rücktitration des überschüssigen $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mit HCl bestimmt.

Um die spezifische Radioaktivität der einzelnen

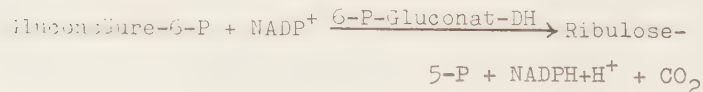
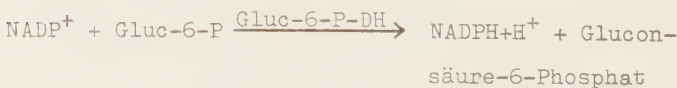
Kohlenstoffatome zu messen, wurde das getrocknete und gewogene Bariumkarbonat in die bei GIBBS et al. beschriebene Übertreibapparatur (32) gegeben. Dann wurde das CO_2 mit 50 %iger H_2PO_4 freigesetzt und in 2 ml Äthanolamin absorbiert (24, 75); anschließend wurde die Lösung mit 13 ml Methanol verdünnt.

Je 10 ml dieser Lösung wurden mit Toluol-Cocktail (7 g Butyl-PBD + 1 l Toluol) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

2.15. Applikation verschiedener radioaktiv markierter Zuckerphosphate an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem

2.15.1. Präparative Darstellung von radioaktiv markiertem Ribulose-5-Phosphat

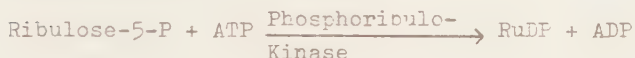
^{14}C -Ribulose-5-Phosphat wurde aus uniform markierter radioaktiver Glucose durch folgende Reaktionen hergestellt (14) :



Das so erhaltene Ribulose-5-Phosphat wurde durch Papierchromatographie (Whatmanpapier Nr. III; Fließmittel Nr.4; s. 2.8.1.) isoliert.

2.15.2. Präparative Darstellung von radioaktiv markiertem Ribulose-1,5-diphosphat

^{14}C -Ribulose-1,5-diphosphat wurde aus uniform markiertem Ribulose-5-Phosphat durch folgende Reaktion gewonnen (1, 57) :



Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 30 °C wurde die Lösung mit Aktivkohle gereinigt, am Exsikkator eingeengt und auf Whatmanpapier Nr. III chromatographisch isoliert (1, 57). Das RuDP wurde aus den Chromatogrammen mit Wasser eluiert und mit NaOH neutralisiert.

2.15.3. Reinigung von radioaktiv markiertem Sedoheptulose-1,7-diphosphat

Das verunreinigte Bariumsalz von radioaktiv markiertem SDP wurde soweit wie möglich gelöst, mit Dowex 50W x 8 100-200 mesh H^+ -Form versetzt, das klare Eluat am Exsikkator eingeengt und auf Whatmanpapier Nr. III im Fließmittelgemisch Nr.4

(s. 2.8.1.) chromatographiert. Das SDP wurde aus den Chromatogrammen eluiert und lyophilisiert.

2.15.4. Präparative Darstellung von radioaktiv markierter 3-Phosphoglycerinsäure

Die auf den Chromatogrammen als 3-Phosphoglycerinsäure angesprochenen Flecken wurden mit Wasser eluiert, rechromatographiert und lyophilisiert.

Es wurde darauf geachtet, daß 3-PGS nur von Langzeitfixierungen von ^{14}C verwendet wurde, damit zuverlässig eine Gleichverteilung der Radioaktivität der einzelnen Kohlenstoffatome des Moleküls gewährleistet wurde.

2.15.5. Bezug der übrigen verwendeten Chemikalien

^{14}C -U-Fructose-1,6-diphosphat	Fa. Buchler, Amersham
^{14}C -U-Fructose-6-Phosphat	Fa. Buchler, Amersham
^{14}C -U-Glucose-6-Phosphat	Fa. Buchler, Amersham
^{14}C -U-Glyoxylsäure	Fa. Buchler, Amersham
Phosphoribulokinase	Fa. Sigma, St. Louis bzw. nach Vorschrift von MÜLLER (62)

Die übrigen Enzyme, Koenzyme und Substrate wurden von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen.

2.15.6. Applikation von ^{14}C -markierten Substanzen
an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem

1,2 ml des unter 2.4. beschriebenen rekonstituierten Chloroplastensystems wurden in die Küvette des Oxigraphen gegeben, O_2 -frei gespült, mit $1,3 \mu\text{Mol}$ Bikarbonat versetzt und belichtet. Nach 20 Sekunden wurde $1 \mu\text{Mol}$ NADP zur Aufrechterhaltung des Elektronenflusses zugegeben. Nach einer Minute erfolgte die Zugabe einer Lösung von acht verschiedenen Substanzen, wobei die Menge jeder einzelnen Substanz pro Versuchsansatz $1 \mu\text{Mol}$ betrug. Von den acht Substanzen war bei jedem neuen Versuchsansatz jeweils eine radioaktiv markiert (s. Tab.3). Die Versuche wurden bei einem O_2 -Partialdruck von ca. $65 \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ bzw. $585 \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ durchgeführt. Die O_2 -Bildungsrate betrug $31 \mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chlorophyll} \times \text{Stunde}$. Die Chlorophyllmenge betrug pro Versuchsansatz $190 \mu\text{g/ml}$, die Beleuchtungsstärke $90\,000 \text{ Lux}$. Nach einer Inkubationszeit von 90 Sekunden wurden die Proben in heißem Methanol abgetötet und der Extrakt papierchromatographisch aufgetrennt.

Tab. 3: Applikation verschiedener radioaktiv markierter Substanzen
an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem

Radioaktive Substanz	Applizierte Radioaktivität [μCi]	Spezifische Aktivität [$\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$]
Glycerat-3-Phosphat	10,0	165,0
Fructose-1,6-diphosphat	10,0	250,0
Sedoheptulose-1,7-diphosphat	1,2	1,5
Ribulose-1,5-diphosphat	4,0	55,5
Glucose-6-Phosphat	10,0	107,0
Fructose-6-Phosphat	10,0	213,0
Ribose-5-Phosphat	8,0	236,0
Glyoxylsäure	7,4	7,4

2.16. Herstellung der für die Chloroplastenpräparation verwendeten Puffer

"Grinding-Medium" (23) (s. 2.2.) :

Sorbit	0,33 molar
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 molar
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	0,01 molar
Na-Ascorbat	0,004 molar

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 n Salzsäure auf pH 6,6 eingestellt. Da Natriumpyrophosphat leicht zu Natriumorthophosphat hydrolysiert, das die CO_2 -Fixierung hemmt, muß die Lösung unmittelbar vor jedem Versuch neu angesetzt werden.

Stammlösung für "Puffer B" und "C" (45) :

Sorbit	0,33 molar
NaNO_3	0,002 molar
EDTA	0,002 molar
Na-Ascorbat	0,002 molar
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,001 molar
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001 molar
K_2HPO_4	0,0005 molar

"Puffer B"

Hepes ⁺⁾ 0,05 molar

NaCl 0,02 molar

Die Substanzen werden in Stammlösung gelöst; dann wird mit 1 n NaOH auf pH 6,7 eingestellt.

"Puffer C"

Hepes ⁺⁾ 0,05 molar

Die Puffersubstanz wird in Stammlösung gelöst und mit 1 n NaOH auf pH 7,6 eingestellt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird Natriumpyrophosphat (0,005 molar) zugegeben.

2.17. Überprüfung der Puffer auf ihren CO_2 -Gehalt

Den von JENSEN und BASSHAM (45) für Versuche an isolierten, intakten Spinatchloroplasten verwendeten Puffern werden keine Karbonatverbindungen zugesetzt. Die Puffer sollten daher vor der exogenen Zugabe von NaHCO_3 kein Karbonat enthalten.

Zur Kontrolle wurde eine definierte Menge an "Puffer C", der unter Luft hergestellt worden war, in eine bei GIBBS et al. (32) beschriebene Über-treibapparat gegeben, eventuell vorhandenes Karbonat mit Phosphorsäure als CO_2 freigesetzt und in

⁺⁾ Hepes: N-2-hydroxyäthylpiperacin-N-2-äthansulfonsäure

Barytlauge aufgefangen. Das ausgefallene Bariumkarbonat wurde getrocknet und gewogen.

Es zeigte sich, daß bei Herstellung von "Puffer C" unter Luft bereits etwa 2 mM Karbonat oder Bikarbonat pro Liter vorhanden waren. Deshalb wurde für diejenigen Versuche, bei denen genau definierte Bikarbonat-Konzentrationen in der Chloroplastensuspension von Bedeutung waren, ein CO_2 -freier Puffer, der unter N_2 -Atmosphäre hergestellt war, verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Abhängigkeit der Glykolatproduktion vom O₂-Partialdruck

3.1.1. Untersuchung der Glykolatproduktion bei sättigendem CO₂-Angebot

Es liegt nahe, die Konzentrationsangabe "0 % O₂" , die bei den Befunden von WHITTINGHAM et al. (89) und GIBBS (29) gemacht wurde, als nicht gemessene O₂-Konzentration zu deuten; vielmehr ist anzunehmen, daß der bei der Photoassimilation von CO₂ unter Stickstoff durch Algen oder Chloroplasten gebildete Sauerstoff nicht völlig entfernt werden konnte.

Es wurde deshalb zunächst der Einfluß von definierten, niedrigen Sauerstoffpartialdrücken auf die Glykolsäureproduktion untersucht.

Dafür wurde erstmals eine potentiometrische Messung des wirklichen O₂-Gehaltes der Chloroplastensuspension eingesetzt. Mit Hilfe einer unterschiedlich starken Stickstoffspülung der Suspension in der Oxigraphenküvette wurden verschiedene Sauerstoffkonzentrationen im Medium eingestellt (s. 2.5.).

Es zeigte sich, daß der prozentuale Anteil von

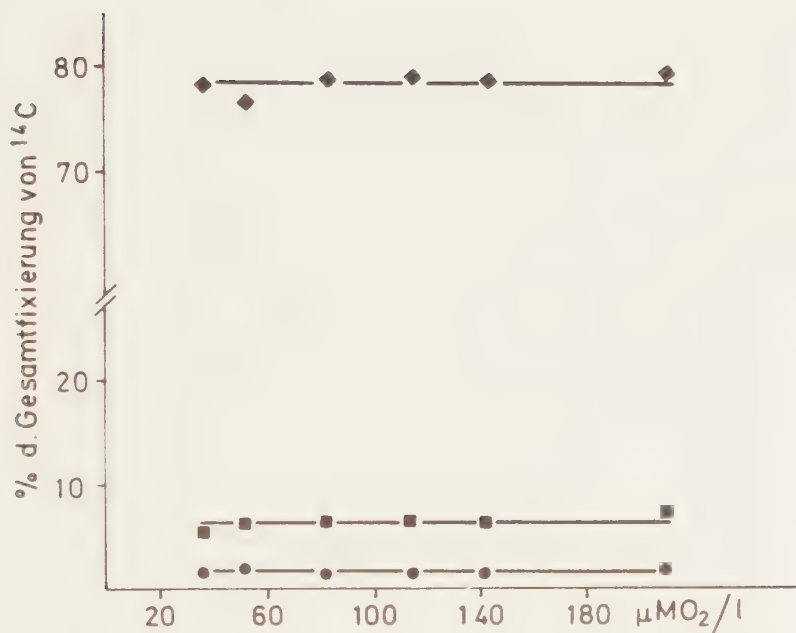


Fig.5: Die prozentualen Anteile von Glykolsäure und anderer wichtiger Stoffwechselprodukte am fixierten ^{14}C in Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck (36-210 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$)

- : Glykolsäure
- : Zuckerdiphosphate
- ◆—◆ : Zuckermomonophosphate + 3-PGS

Glykolat am gesamtfixierten Radiokohlenstoff bei O_2 -Partialdrücken, die unterhalb der O_2 -Sättigung des Wassers unter Luft liegen (Sättigungswert $0,2673 \mu M O_2/ml$ bei $20^\circ C$), weitgehend unabhängig ist vom Gehalt des Mediums an Sauerstoff (Fig.5) und bei sämtlichen Versuchen nach einer Fixierungsdauer von 3 Minuten im Mittel $1,3 \%$ betrug, wobei die Extremwerte bei $1,0$ und $1,9 \%$ lagen.

Außer den prozentualen Anteilen der Glykolsäure sind in Fig.5 noch die der Zuckerdiphosphate und von 3-PGS + Zuckermonophosphaten aufgetragen.

Ihre prozentualen Anteile verhielten sich über den gesamten untersuchten Bereich ähnlich wie die der Glykolsäure, d.h. daß der O_2 -Partialdruck der Suspension, solange es sich um niedrige O_2 -Konzentrationen handelt, keinen Einfluß auf die Verteilung des ^{14}C hat.

Wie Versuche von WHITTINGHAM et al. (89) und ELLYARD und GIBBS (26) zeigen, besteht aber bei höheren Sauerstoffkonzentrationen des Mediums eine direkte Beziehung zwischen dem Gehalt an exogen zugegebenem O_2 und dem Anteil an assimiliertem Kohlenstoff, der in Glykolat eingebaut wird. Dieser Befund konnte bestätigt werden (Fig.6).

Die vom O_2 -Partialdruck lineare Abhängigkeit des prozentualen Einbaus von ^{14}C in Glykolat beginnt



Fig. 2: Die prozentualen Anteile von Glykolsäure am fixierten ^{14}C in Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck (70-890 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$)

Tab. 4: Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Gesamtfixierung von ^{14}C und auf die ^{14}C -Verteilung der angeführten Stoffwechselprodukte

O ₂ -Konzentration im Medium [$\mu\text{Mol/l}$]	Fixierungsrate [$\mu\text{Mol } ^{14}\text{C}/\text{h} \cdot \text{mg Chlor. x Std.}$]	% der Gesamtfixierung von ^{14}C		
		Gesamt-Zucker- Phosphate + 3-Phosphoglycerin- säure	Unlös- (Stärke)	Glykolsäure
77,5	~ 30	93,6	3,6	0,8
563,5	27,2	87,8	2,3	4,8
773,0	24,3	83,6	1,8	11,3
888,6	9,3	80,0	1,6	14,3

zwischen 130 und 200 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$, wobei zuweilen Schwankungen zu beobachten sind, die von der Qualität der jeweiligen Chloroplastenpräparation abhängen dürften, das Ergebnis jedoch insgesamt nicht verändern.

Der in Fig.6 aufgetragene erste Meßpunkt liegt noch im Bereich der den prozentualen Anteil am assimilierten Kohlenstoff in Glykolat nicht beeinflussenden Sauerstoffkonzentrationen (s. Tab.4; Fig.5). Die übrigen Meßpunkte entsprechen Stickstoff-Sauerstoffgemischen mit 58, 67 und 75 % O_2 -Anteilen. Man erkennt bei diesen Sauerstoffkonzentrationen eine deutliche Steigerung der prozentualen Glykolatanteile von 1,6 - 19 %, sowie eine lineare Abhängigkeit der prozentualen Anteile der Glykolsäure vom O_2 -Gehalt im Medium.

In Fig.6 läßt sich demnach ein zweiphasiger Kurvenverlauf feststellen, der zum einen durch den sauerstoffunabhängigen, zum anderen durch den sauerstoffabhängigen prozentualen Einbau von Kohlenstoff in Glykolsäure am assimilierten Kohlenstoff gekennzeichnet wird.

Die gefundenen Werte liegen gegenüber den Daten von ELLYARD und GIBBS (26) und WHITTINGHAM et al. (89) relativ niedrig. Dies läßt sich auf die hohe Bikarbonatkonzentration (7,9 mMol/l) zurückführen, die eingesetzt werden mußte, um trotz

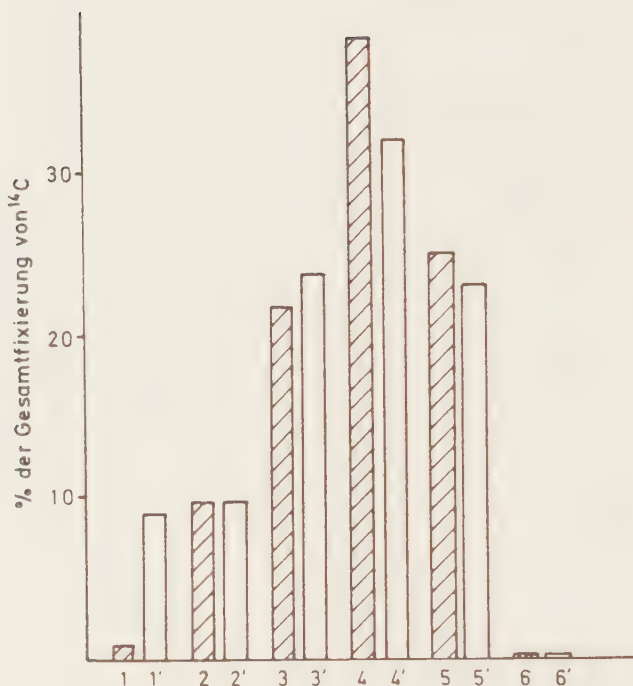


Fig. 7: Vergleich der ^{14}C -Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte unter niedrigem ($78 \mu\text{M O}_2/\text{l}$) und hohem O_2 -Partialdruck ($770 \mu\text{M O}_2/\text{l}$)

78 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$: schraffiert	1-1': Glykolsäure
770 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$: weiß	2-2': Zuckerdiphosphate
	3-3': Zuckermonophosphate
	4-4': 3-PGS
	5-5': Triosephosphate
	6-6': Glycerinsäure

Stickstoffspülung zuverlässig ein sättigendes CO_2 -Angebot zu erhalten.

Vergleicht man die prozentualen Anteile am gesamtfixierten ^{14}C der Zuckerphosphate + 3-PGS mit denen der Glykolsäure in Tab. 4, so zeigt sich, daß der Prozentsatz der genannten Phosphate (wie auch der von Stärke) bei steigendem O_2 -Partialdruck zugunsten von Glykolsäure abnimmt.

Ein Vergleich der ^{14}C -Markierung der papierchromatographisch aufgetrennten Stoffwechselprodukte von Versuchen, die unter niedrigem O_2 -Partialdruck ($70\text{--}80\ \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$) mit solchen, die unter hohem O_2 -Partialdruck durchgeführt wurden ($770\ \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$), zeigt, daß die Sauerstoffkonzentration die ^{14}C -Markierung des Glykolats am stärksten beeinflusst (Fig.7).

5.1.1. Kinetikversuche zur Überprüfung der experimentellen Genauigkeit der ^{14}C -Fixierung während des gewählten Zeitraums von drei Minuten.

Zur Klärung der Frage, ob der gemessene Einbau von ^{14}C in Glykolsäure eine echte Rate oder einen zufälligen Wert darstellt, der durch Summation verschiedener Werte entstanden sein könnte, wurde eine Kinetik der ^{14}C -Markierung der Fixierungsprodukte während der gewählten Versuchszeit von drei Minuten

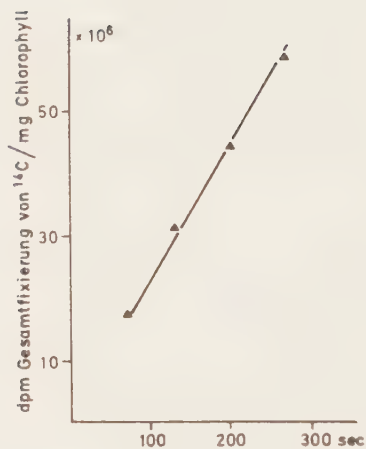


Fig. 8a

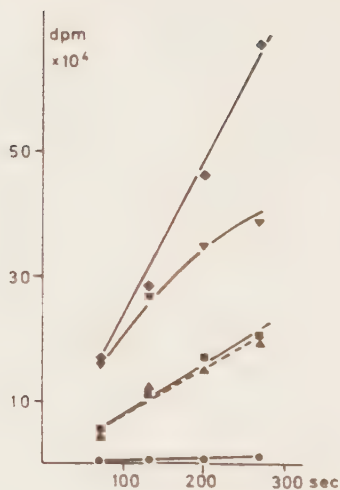


Fig. 8b

Fig. 8a, 8b: Kinetik der Gesamtfixierung und der ¹⁴C-Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: 76 μ M/l)

- ▲—▲ : Gesamtfixierung
- : Glykolsäure
- : Zuckerdiphosphate
- ▼—▼ : Zuckermonophosphate
- ◆—◆ : 3-PGS
- ▲- -▲ : Triosephosphate



Fig. 9a

Fig. 9a, 9b: Kinetik der Gesamtfixierung und der ^{14}C -Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: $771 \mu\text{M/l}$)

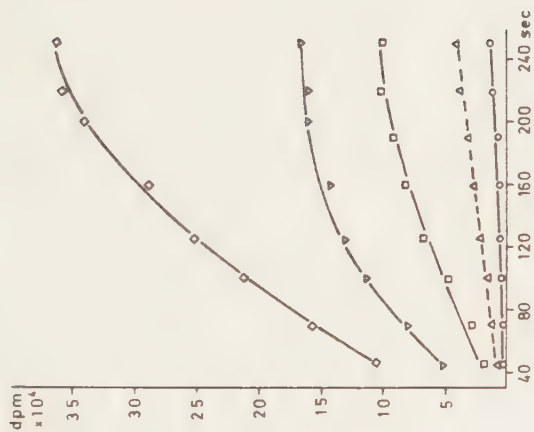


Fig. 9b

- Δ — Δ : Gesamtfixierung
 $\text{O}—\text{O}$: Glykolsäure
 $\square—\square$: Zuckerdiphosphate
 $\nabla—\nabla$: Zuckermomophosphate
 $\diamond—\diamond$: 3-Py
 $\Delta—\Delta$: Triosephosphate

erstellt. Die Ergebnisse sind in Fig. 8a, 8b und 9a, 9b zusammengestellt.

Die Figuren 8a, 8b zeigen besonders deutlich, daß während der ersten drei Minuten sowohl die Gesamtfixierung als auch der Einbau von ^{14}C in die übrigen aufgezeigten Stoffwechselprodukte nahezu linear erfolgt. Es handelt sich bei den 3Minuten-Werten somit um echte Raten, die nicht durch Summation verschiedener Raten vorgetäuscht werden. Bei niedrigem und hohem O_2 -Partialdruck unterscheiden sich die Ergebnisse nur in der Höhe der Gesamtfixierungsrate und vor allem in der ^{14}C -Markierung von Zuckerdiphosphaten und Triosephosphaten.

Weiterhin zeigen die Kurven, daß die Menge an gebildeter ^{14}C -Glykolsäure unter hohem O_2 -Partialdruck nicht wesentlich höher sein muß als unter niedrigem O_2 -Partialdruck, da ja auch die Gesamtfixierung aufgrund des Warburg-Effekts wesentlich geringer ist.

Bei der Darstellung der prozentualen Anteile der Glykolsäure erhält man natürlich bei hoher O_2 -Konzentration höhere Werte.

1.1.4. Der Einfluß des Alters der Mikroplastenpräparation auf die Glykolatbildung

Da die Dauer eines Gesamtversuches mit mehreren Proben immerhin bis zu einer Stunde betrug, war

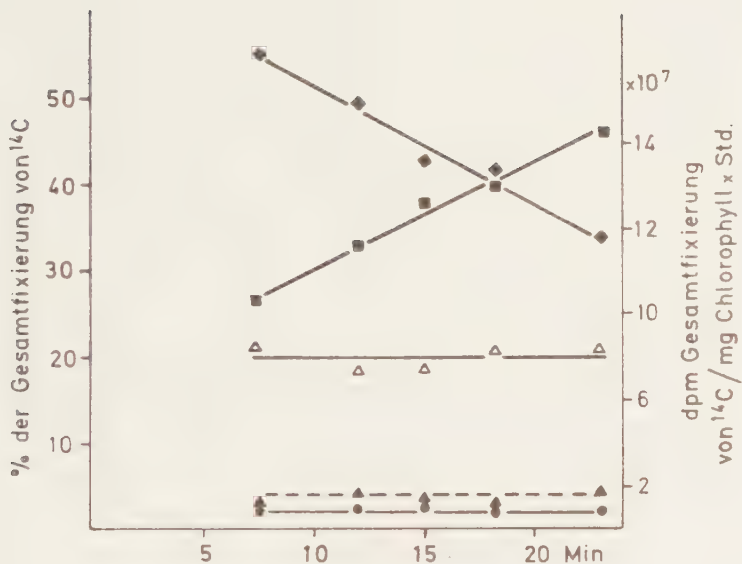


Fig.10: Gesamtfixierung und prozentuale Anteile der wichtigsten Stoffwechselprodukte am assimilierten Kohlenstoff in Abhängigkeit vom Alter der Chloroplastenpräparation (^{14}C -Fixierungsdauer jeweils 3 Minuten)

Δ — Δ : Gesamtfixierung von ^{14}C

●—● : % Glykolsäure

■—■ : % Zuckerdiphosphate

◆—◆ : % Zuckerm. + 3-PGS

▲---▲ : % Triosephosphate

sicherzustellen, daß die Versuchsergebnisse nicht durch einen Alterungsprozeß der Chloroplastenpräparation verfälscht werden. Dies wurde in folgendem Versuch geprüft:

An dem Antriebsaggregat eines Rotationsverdampfers (Büchi Rotavapor) wurde ein Zweihalskolben so befestigt, daß er sich in einem thermostatisierten Wasserbad (20 °C) drehen konnte und daß der Kolbeninhalt laufend mit Stickstoff gespült werden konnte (10). In den Kolben wurden 12 ml einer Suspension intakter Spinatchloroplasten (150 µg Chlorophyll/ml) in "Puffer C" (45) und Bikarbonat (7,9 mMol/l) gegeben. Der rotierende Kolben wurde mit zwei 300-W-Astraluxlampen belichtet.

Dem Rundkolben wurden nach 3, 6, 9, 14 und 18 Minuten Proben entnommen, in die Küvette des Oxigraphen gegeben und dort weiter eine Minute vorbelichtet. Danach wurde radioaktives Bikarbonat zugesetzt, drei Minuten weiter belichtet und die Chloroplastensuspension sodann in Methanol abgetötet. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie üblich. Die Ergebnisse sind in Fig.10 dargestellt.

Die Fig.10 zeigt, daß

1. die Gesamtfixierung von ^{14}C /mg Chlorophyll x , Stunde sich während der Versuchsdauer von 23 Minuten nicht ändert;
2. der Gehalt an Zuckerdiphosphaten in dem Maße ansteigt, wie der Gehalt an 3-PGS + Zuckermorphos-

phaten abnimmt;

3. der Gehalt an Glykolsäure (und Triosephosphaten) jedoch unabhängig vom Alter der Chloroplastenpräparation ist.

Demnach ist eine Verfälschung der Versuchsergebnisse, soweit sie die Glykolsäureproduktion betreffen, durch Alterungserscheinungen der Chloroplasten nicht zu befürchten.

3.2. Charakterisierung der zwei glykolsäureproduzierenden Reaktionen

3.2.1. Der Einfluß der CO_2 -Konzentration auf die Glykolatbildung

Nach JENSEN und BASSHAM (45) soll die Rate der CO_2 -Fixierung durch isolierte, intakte Spinatchloroplasten ihren Sättigungswert bei etwa 3 mM Bikarbonat/l erreichen. Versuche an Spinatchloroplasten von BUCHANAN und SCHÜRMANN (18) zeigen dagegen eine Sättigung bereits bei 1 mM Bikarbonat/l. Die Versuchsergebnisse von ROBINSON und GIBBS (67) liegen zwischen diesen Werten (2 mM Bikarbonat/l).

Sämtliche bisher beschriebenen Versuche wurden mit einer Konzentration von 7,9 mM Bikarbonat/l durchgeführt. Damit war eine Sättigung der CO_2 -Fixie-

nung gewährleistet, selbst dann, wenn man annimmt, daß durch die Spülung der Küvette mit Stickstoff oder Stickstoff plus Sauerstoff ein Teil des eingesetzten Bikarbonats als CO_2 ausgeblasen wird. Bei diesen Versuchen wurde nur der O_2 -Partialdruck variiert.

Im folgenden werden nun Versuche beschrieben, bei denen die O_2 -Konzentration jeweils konstant gehalten (78 bzw. 770 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$) und die Konzentration an Bikarbonat verändert wurde. Der Einbau von ^{14}C in die verschiedenen Fixierungsprodukte, vor allem in Glykolsäure, wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig.11 und 12 zusammengestellt.

1. Gesamtfixierung von ^{14}C :

Wie in den von JENSEN und BASSHAM beschriebenen Versuchen (45) trat eine Sättigung der CO_2 -Fixierung bei etwa 3 mmolarem Bikarbonat auf (Fig.11,12; Tab.5).

Berechnet man aus diesen angegebenen Werten annähernd die K_M der Chloroplasten gegenüber CO_2 bei niedriger und hohem O_2 -Partialdruck, so kommt man auf ungefähr gleiche Werte: 1×10^{-4} molar unter niedriger O_2 - (78 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$) und 2×10^{-4} molar bei hoher O_2 -Konzentration (770 $\mu\text{M O}_2/\text{l}$). Die entsprechenden Werte für v_{max} betragen 80 bzw. 20 $\mu\text{M CO}_2/\text{mg Chlorophyll} \times \text{Stunde}$. Dies besagt, daß O_2 die CO_2 -Fixierung nicht kompetitiv hemmt.

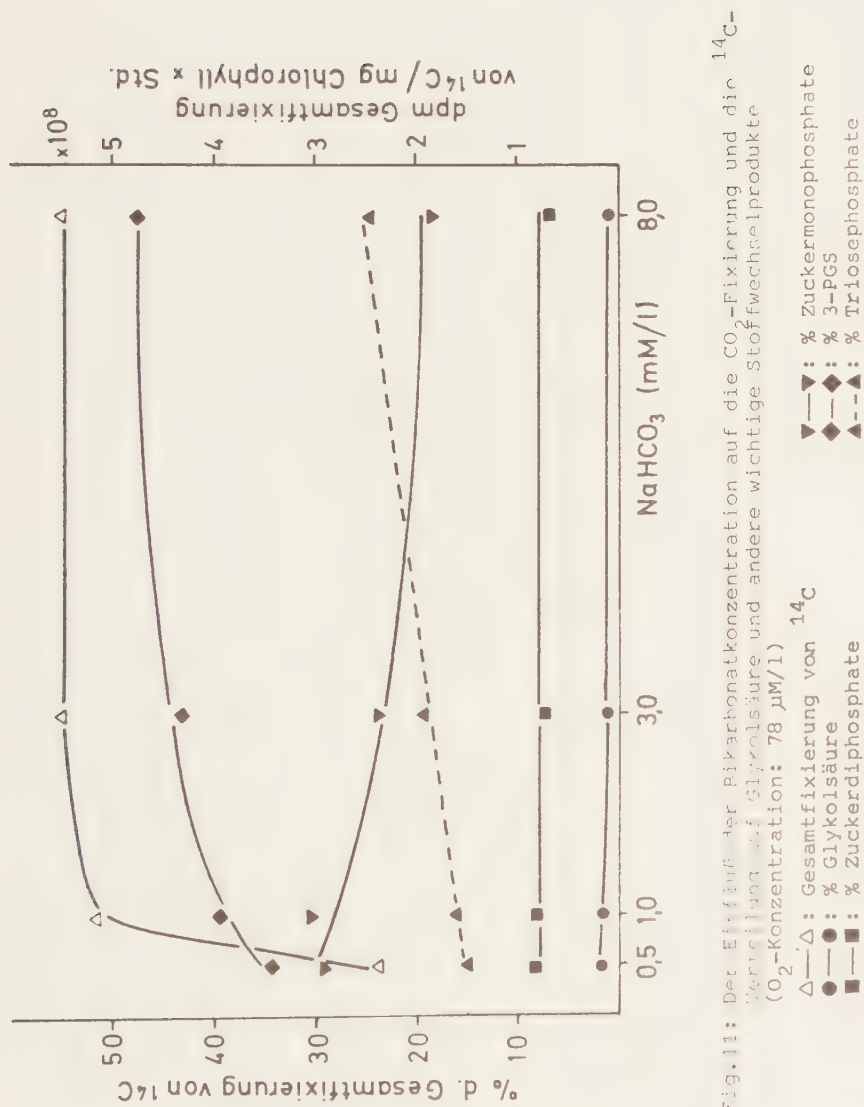


Fig. 11: Der Einfluß der Bikarbonatkonzentration auf die CO_2 -Fixierung und die Verteilung der Glykolsäure und andere wichtige Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: $78 \mu\text{M/l}$) ^{14}C

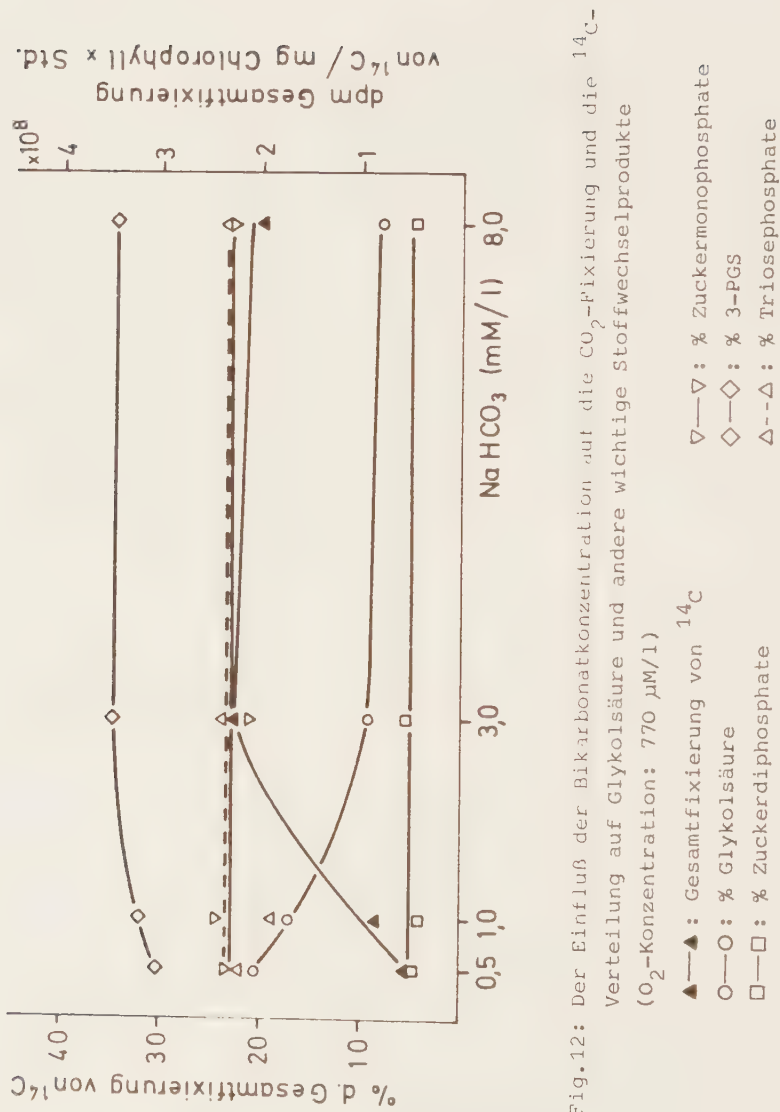


Fig. 12: Der Einfluß der Bikarbonatkonzentration auf die CO_2 -Fixierung und die ^{14}C -Verteilung auf Glykolsäure und andere wichtige Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: $770 \mu\text{M/l}$)

Tab.5: Abhängigkeit der Bildung von radioaktiv markierter
Glykolsäure von der Bikarbonatkonzentration

CO ₂ -Konz. [mM/l]	Gesamtfixiert. [dpm x 10 ⁷ /mg Chl. x Std. O ₂ -Konz. 78 µM/l]	Glykolatprodukt. [dpm x 10 ³ /mg Chl. x Std. O ₂ -Konz. 78 µM/l]	Gesamtfixiert. [dpm x 10 ⁷ /mg Chl. x Std. O ₂ -Konz. 770 µM/l]	Glykolatprodukt. [dpm x 10 ³ /mg Chl. x Std. O ₂ -Konz. 770 µM/l]
0,5	27,1	50,7	5,49	136,8
1,0	11,7	87,4	8,35	172,8
2,0	11,1	67,3	23,03	253,0
3,0	7,2	50,2	19,75	196,9

2. Markierung der Fixierungsprodukte:

a) Markierung der Glykolsäure: Wie ROBINSON und GIBBS (67) stellten auch wir eine Abnahme des prozentualen Anteils an Glykolsäure bei steigender Bikarbonatkonzentration fest (Fig. 11, 12).

Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Versuche von HAN und ELEY (38) mit *Anacystis nidulans* und *Chlorella*.

Es ist besonders bemerkenswert, daß selbst bei CO_2 -Konzentrationen, die weit über der Sättigungskonzentration der CO_2 -Fixierung liegen, immer noch Glykolsäure gebildet wird, daß sich aber andererseits der Prozentsatz an radioaktiv markiertem Glykolat nur so lange deutlich ändert, wie dies auch bei der CO_2 -Fixierung der Fall ist. Kontrollversuche mit Bikarbonatkonzentrationen über 8 mM/l erbrachten keine Änderung dieser Ergebnisse (vgl. ROBINSON und GIBBS (67)).

b) Markierung der übrigen Fixierungsprodukte: Dem Abfall des relativen ^{14}C -Einbaus in Glykolat mit steigendem CO_2 -Angebot entspricht eine prozentuale Zunahme der ^{14}C -3-PGS und der ^{14}C -Zuckermonophosphate bei hohem O_2 -Partialdruck, bzw. von ^{14}C -3-PGS und Triosephosphaten bei niedrigem O_2 -Partialdruck.

In der Tab.5 sind im Gegensatz zu Fig.11 und 12 die Mengen an radioaktiv markierter Glykolsäure, die

bei den verschiedenen CO_2 -Konzentrationen gebildet wurden, aufgetragen. Es zeigt sich deutlich, daß bei diesem Versuch die gebildete Gesamtmenge an radioaktiv markierter Glykolsäure unter hohem O_2 -Partialdruck mindestens doppelt so groß ist wie unter niedrigem O_2 -Partialdruck, obwohl die Gesamtfixierung bei hohem O_2 -Angebot aufgrund des Warburg-Effekts auf etwa 50 % erniedrigt ist.

3.2.2. Einfluß des O_2 -Partialdruckes auf die Glykolatproduktion bei limitierendem CO_2 -Angebot

Aufgrund des Befundes, daß bei limitierendem CO_2 -Angebot eine verstärkte Glykolatsynthese erfolgt, ergab sich die Frage, ob sich die beiden Reaktionen der Glykolatbildung, die bei sättigendem CO_2 -Angebot in Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck gefunden wurden, auch unter CO_2 -Mangel nachweisen lassen.

Deshalb wurde die O_2 -Abhängigkeit der Glykolatsynthese bei limitierendem Bikarbonatangebot (0,9 mM/l) in der Küvette des Oxigraphen untersucht. Die Versuche wurden, wie in 2.6.1. und 3.1.1. beschrieben, durchgeführt und die Ergebnisse in Fig.13 dargestellt.

Das Ausmaß der CO_2 -Fixierung würde zunächst infolge des Warburg-Effekts bei steigendem O_2 -Partialdruck einen stetigen Abfall erwarten lassen.

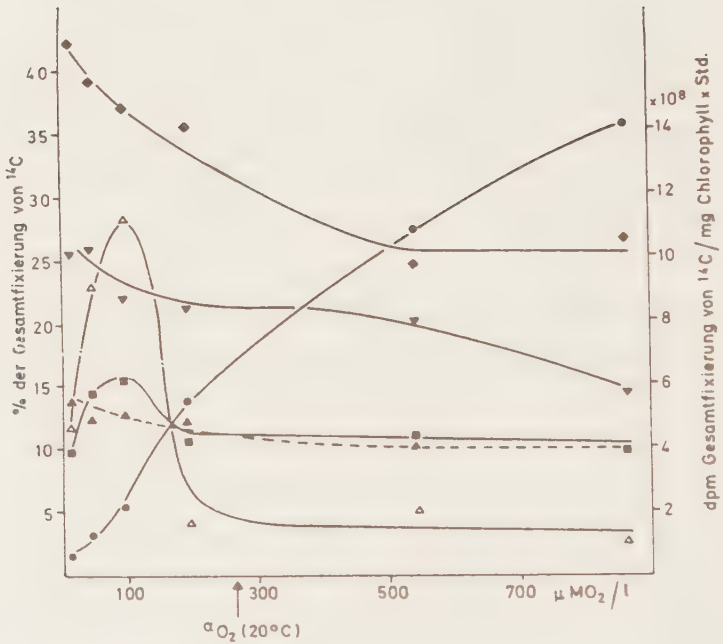


Fig.13: Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung und der prozentualen Anteile (am assimilierten Kohlenstoff) von Glykolsäure und anderer wichtiger Stoffwechselprodukte vom O_2 -Partialdruck bei limitierendem Bikarbonatangebot ($O_3,9 \text{ mM/l}$)

- Δ — Δ : Gesamtfixierung
 $\bullet$ — $\bullet$: % Glykolsäure
 $\blacksquare$ — $\blacksquare$: % Zuckerdiphosphate
 $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$: % Zuckermonophosphate
 $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: % 3-PGS
 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: % Triosephosphate

Dies ist jedoch nicht der Fall. Es tritt vielmehr eine Optimumskurve auf (s. Fig.24). Im Anhang wird auf dieses Phänomen noch näher eingegangen.

Im Kurvenverlauf des prozentualen Anteils der Glykolsäure am fixierten Kohlenstoff ist das bei sättigendem CO_2 -Angebot unter niedrigem O_2 -Partialdruck auftretende Plateau kaum mehr erkennbar. Gleich bleibt jedoch die Erscheinung, daß der Prozentsatz an Glykolsäure selbst bei niedrigsten O_2 -Konzentrationen nicht gegen Null geht. Es finden sich nämlich bereits bei einer O_2 -Konzentration von $12 \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ 1,4 % des fixierten ^{14}C im Glykolat. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß auch unter CO_2 -Mangel beide glykolsäureproduzierenden Reaktionen ablaufen.

Mit zunehmendem O_2 -Partialdruck steigt der Gehalt an Glykolsäure nahezu linear bis auf etwa 35 % des fixierten Kohlenstoffs an. Diese unter CO_2 -Mangel gefundenen höheren Werte decken sich mit den Ergebnissen von ELLYARD und GIBBS (26) und WHITTINGHAM et al. (89).

Außerdem zeigt die Fig.13 deutlich, daß der Anstieg des prozentualen Anteils der Glykolsäure auf Kosten von 3-PGS, Zuckermonophosphaten und Triosephosphaten verläuft. Der Prozentsatz an radioaktiv markierten Zuckerdiphosphaten ändert sich (wie auch bei sättigendem CO_2 -Angebot) mit stei-

gendem O_2 -Partialdruck nur in geringem Maße.

3.2.3. Vergleich der Bildung von Glykolat und anderen Stoffwechselprodukten unter Rotlicht und Weißlicht

Die bisher beschriebenen Versuche wurden unter Weißlicht mit einer Intensität von 80 000 bis 100 000 Lux durchgeführt. Es war deshalb zu prüfen, ob nicht eine der beiden glykolsäureproduzierenden Reaktionen eine mehr oder weniger unspezifische Photooxidation durch Blaulicht darstellt (Kowallik-Effekt (49)).

Allerdings hatten Versuche von BECKER et al. (12) an der Grünalge Chlorella gezeigt, daß bei Blaulichteinstrahlung kein Glykolat gebildet wird. Sie beobachteten vielmehr bei der Bestrahlung mit Rotlicht die gleiche Glykolatexkretion wie mit Weißlicht.

Für unsere Versuche wurde Rotlicht der Wellenlänge $\lambda > 630$ nm (Filter der Fa. Schott, Nr. RG 630 nm; Dicke 4 mm) und Weißlicht, beide mit einer Intensität von 62 000 Lux in die Küvette des Oxiographen eingestrahlt. Die Konzentration an Bikarbonat betrug 7,9 mM/l.

Die in Fig.14 - 16 aufgezeigten Versuchsergebnisse resultieren aus zwei praktisch identischen

Chloroplastenpräparationen. Die erste Präparation wurde für Versuche unter Weißlicht, die zweite für Versuche unter Rotlicht verwendet. Die Auftrennung in zwei Präparationen erfolgte, um nicht allzu stark gealterte Chloroplasten verwenden zu müssen (die Versuchszeit betrug insgesamt etwa drei Stunden).

Den Fig.14 - 16 sind folgende Ergebnisse zu entnehmen:

1. Gesamtfixierung von ^{14}C :

In Fig.14 ist die Gesamtfixierung in Abhängigkeit vom Sauerstoff aufgetragen. Im Bereich bis etwa $100\ \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ wird die Fixierung von ^{14}C unter Weißlicht um etwa 20-30 % gesteigert, dagegen wird sie oberhalb von $100\ \mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ unter Rotlicht um 20 % gefördert. Insgesamt gesehen zeigt aber die CO_2 -Fixierung gute Parallelität. Wie auch unter CO_2 -Mangel läßt sich auch hier eine deutlich ausgeprägte Optimumskurve erkennen.

2. Markierung der Fixierungsprodukte:

Die prozentualen Anteile der Glykolsäure (Fig.15) zeigen unter Rot- und Weißlicht identische Werte. Der Übergang von der O_2 -unabhängigen zur O_2 -abhängigen Reaktion der Glykolatsynthese läßt sich deutlich erkennen. Er liegt wie bei den früher geschilderten entsprechenden Versuchen bei $120\ \mu\text{M O}_2/\text{l}$.

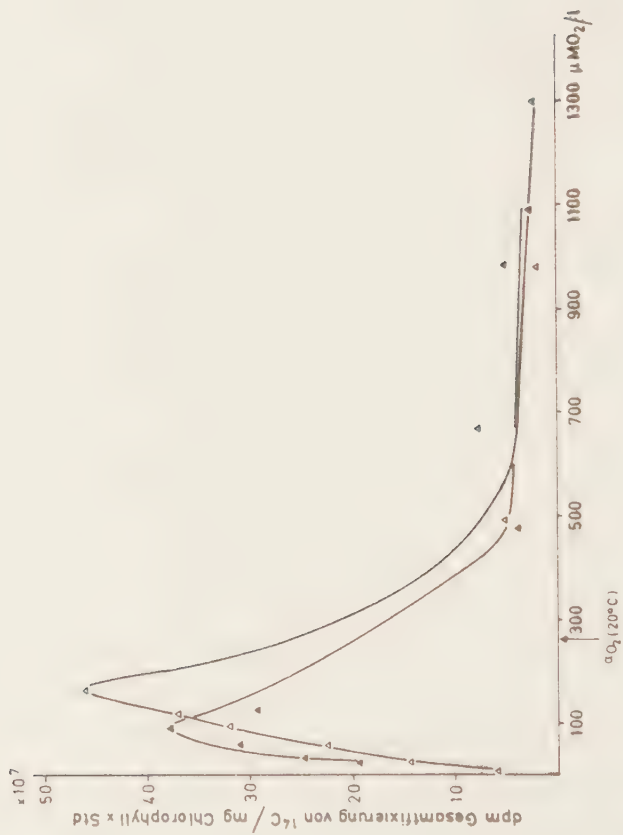


Fig.14: Gesamtfixierung von $^{14}\text{C}/\text{mg}$ Chlorophyll x Stunde in Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck unter Rot- und Weißlicht

▲—▲: Weißlicht

△—△: Rotlicht



Fig.15: Prozentuale Anteile von Glykolsäure und anderer wichtiger Stoffwechselprodukte am fixierten ^{14}C

Weißlicht: $\bullet$: Glykolsäure Rotlicht: $\circ$: Glykolsäure
 ∇ : Zuckermonophosphate ∇ : Zuckermonophosphate
 $\blacktriangle$: Zuckermonophosphate $\triangle$: Zuckermonophosphate



Fig. 10: Prozentuale Anteile an Gesamtfixation und 3-PGS im Medium ^{14}C

Weiblich: ■—■: Gesamtfixation () () : Gesamtfixation ◇—◇: 3-PGS
 3-PGS: ◆—◆: 3-PGS

Demnach ist keine der beiden glykolsäureproduzierenden Reaktionen auf den Blaulichtanteil des Weißlichts zurückzuführen.

Auch die prozentualen Anteile der übrigen Fixierungsprodukte, sowie die O_2 -Abhängigkeit ihrer ^{14}C -Markierung zeigen weitestgehende Übereinstimmung.

3.2.4. Kinetikversuche zur Überprüfung der Abhängigkeit des linearen Einbaus von ^{14}C in Glykolat von der Linearität der

Fixierung

In weiteren Kinetikversuchen wurde untersucht, ob die Glykolatbildung direkt mit der CO_2 -Fixierung gekoppelt ist. Hierfür wurden die Markierungskinetiken über einen längeren Zeitraum ausgedehnt. Bekanntlich kommt nach längeren Versuchszeiten die CO_2 -Fixierung durch isolierte Chloroplasten zum Erliegen.

Deshalb wurden während eines Zeitraums von 30 Minuten der Küvette des Oxigraphen laufend Proben entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Fig.17 und 18 dargestellt. Die Daten zeigen, daß die CO_2 -Fixierung vor allem unter hohem O_2 -Partialdruck (s. Fig.18) bereits nach 9 Minuten nicht mehr linear war und dann lang-

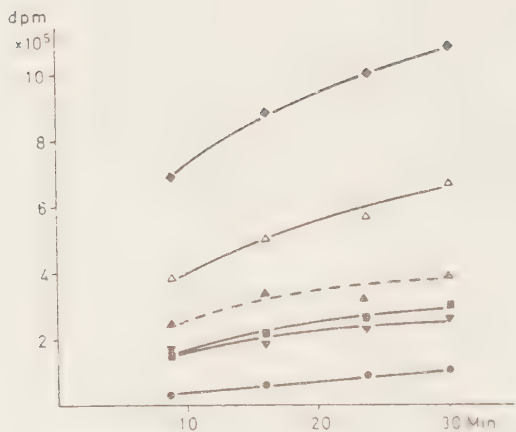


Fig. 17: CO_2 -Fixierung und ^{14}C -Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte in Abhängigkeit von der Zeit (O_2 -Konzentration: $55 \mu\text{M/l}$)

Δ—Δ: Gesamtfixierung von ^{14}C /mg Chlorophyll ($\times 100$)

●—●: Glykolsäure

■—■: Zuckerdiphosphate

▼—▼: Zuckermomonophosphate

◆—◆: 3-PGS

▲—▲: Triosephosphate

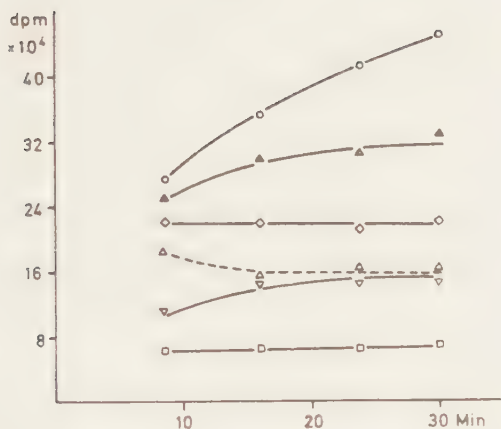


Fig.18: CO_2 -Fixierung und ^{14}C -Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte in Abhängigkeit von der Zeit (O_2 -Konzentration: $700 \mu\text{M/l}$)

- ▲—▲: Gesamtfixierung von ^{14}C /
mg Chlorophyll ($\times 100$)
- O—O: Glykolsäure
- : Zuckerdiphosphate
- ▽—▽: Zuckermonophosphate
- ◇—◇: 3-PGS
- △---△: Triosephosphate

sam zum Stillstand kam.

Der Einbau von ^{14}C in Glykolsäure steigt aber auch nach dem Stillstand der CO_2 -Fixierung weiter an, was beweist, daß vor allem die O_2 -abhängige Bildung der Glykolsäure nicht direkt an die Assimilation von CO_2 gebunden ist. Im weiteren Verlauf des Versuches unter hohem O_2 -Partialdruck (Fig.18) wird Glykolsäure sogar die am stärksten radioaktiv markierte Substanz.

3.3. Versuche zur Identifizierung der Vorläuferverbindungen der oxidativen Glykolatproduktion

3.3.1. Kinetik der ^{14}C -Markierung bei sehr kurzen Fixierungszeiten

Aus den bis jetzt geschilderten Versuchen lassen sich keine Aussagen über die Vorläuferverbindungen der Glykolsäure machen. Es wurde deshalb versucht, erste Hinweise auf Präkursoren durch eine ^{14}C -Markierungskinetik mit sehr kurzen Fixierungszeiten zu erhalten. Entsprechende Versuche mit längeren ^{14}C -Fixierungszeiten wurden schon früher beschrieben (BASSHAM und JENSEN (7)). Sie zeigen, daß Glykolat erst nach der ^{14}C -Inkorporation in Zuckerphosphate radioaktiv markiert wird. Allerdings wurden diese Versuche nicht im Hinblick

auf mehrere Möglichkeiten der Glykolatsynthese durchgeführt; Angaben über den O_2 -Partialdruck fehlen in diesen Arbeiten. Deshalb sollten die eigenen Versuche erstens mit kürzeren Fixierungszeiten und zweitens bei definierten O_2 -Partialdrücken unternommen werden.

Die Versuchsdurchführung geschah in üblicher Weise; es wurden lediglich aliquote Mengen der Chloroplastensuspension möglichst schnell hintereinander nach dem Einspritzen von $NaH^{14}CO_3$ -Lösung entnommen. Die O_2 -Partialdrücke betrugen 90 bzw. $669 \mu M O_2/l$.

Die Ergebnisse sind in Fig. 19a-c und 20a-c dargestellt.

Die Abbildungen 19a, 19b und 20a, 20b zeigen den linearen Einbau von ^{14}C in verschiedene Stoffwechselprodukte mit Ausnahme von Zuckermonophosphaten und Triosephosphaten. Die Addition dieser beiden Raten ergibt jedoch ebenfalls eine Gerade.

Die prozentuale Darstellung der Markierungskinetik zeigt aber (Fig. 19c, 20c), daß der Prozentsatz des ^{14}C -Einbaus in Glykolat, sowohl unter niedrigem als auch unter hohem O_2 -Partialdruck, innerhalb der ersten 20 Sekunden um etwa die Hälfte abnimmt und erst dann einen konstanten Wert erreicht, der sich nun innerhalb von 3-5 Minuten nicht mehr ändert.

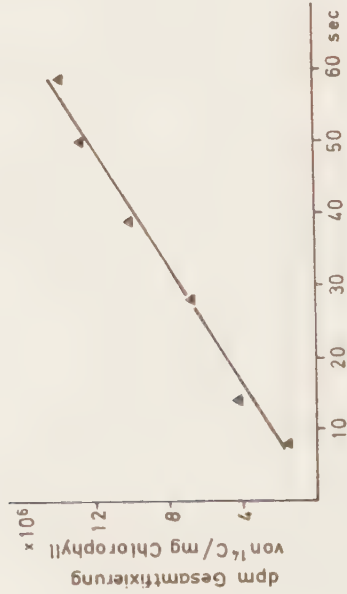


Fig. 19a

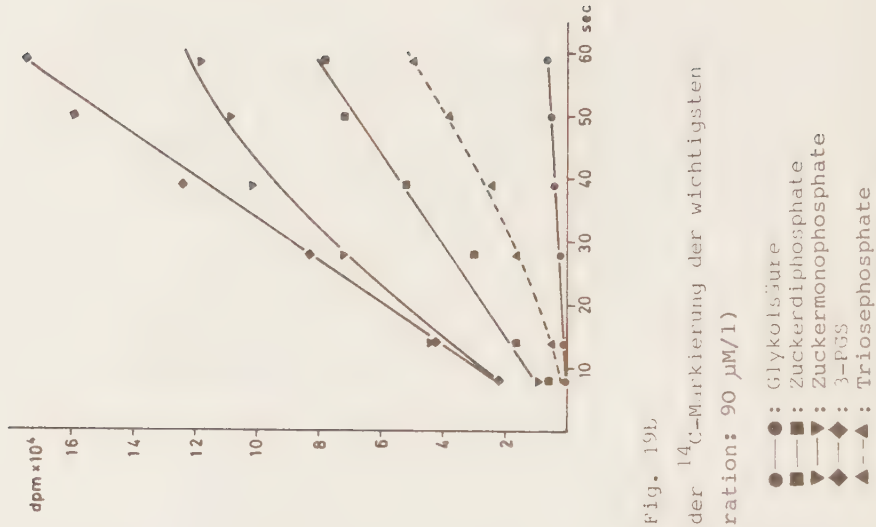


Fig. 19b

Fig. 19a, 19b: Kinetik der Gesamtfixierung und der ^{14}C -Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: $90 \mu\text{M/l}$)

- ▲—▲ : Gesamtfixierung
- : Glykolsäure
- : Zuckerdiphosphate
- ▼—▼ : Zuckermonophosphate
- ◆—◆ : 3-PGS
- ▲—▲ : Triosephosphate

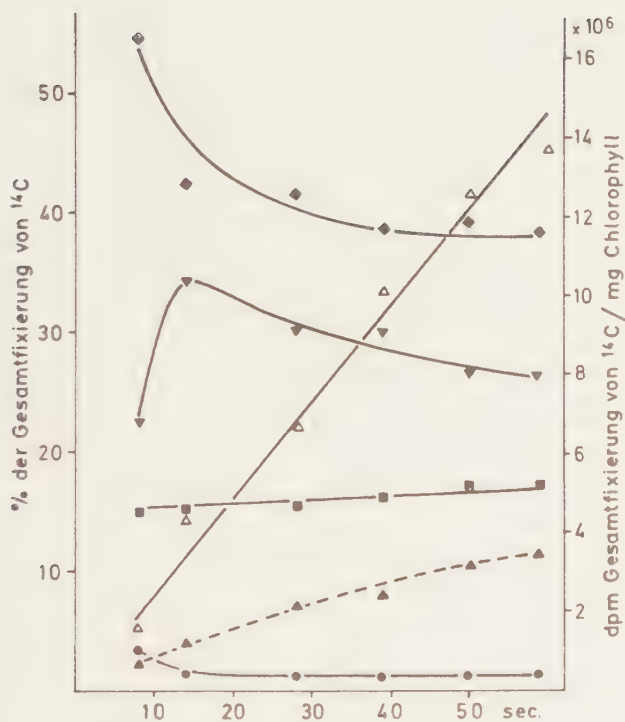


Fig. 19c: Prozentuale Anteile von Glykolsäure und anderer wichtiger Stoffwechselprodukte am assimilierten ^{14}C (O_2 -Konzentration: $90 \mu\text{M/l}$)

- Δ — Δ : Gesamtfixierung
- $\bullet$ — $\bullet$: % Glykolsäure
- $\blacksquare$ — $\blacksquare$: % Zuckerdiphosphate
- $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$: % Zuckermorphosphate
- $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: % 3-PGS
- $\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$: % Triosephosphate

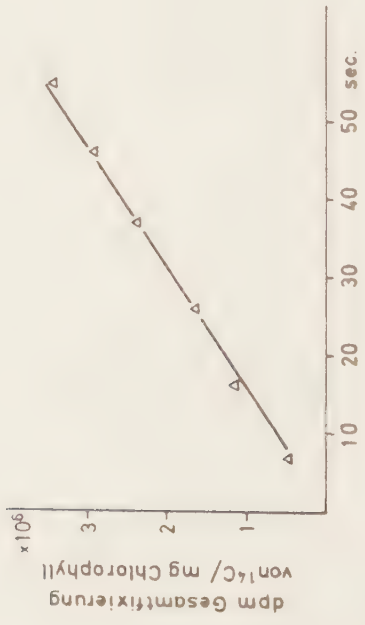


Fig. 20a

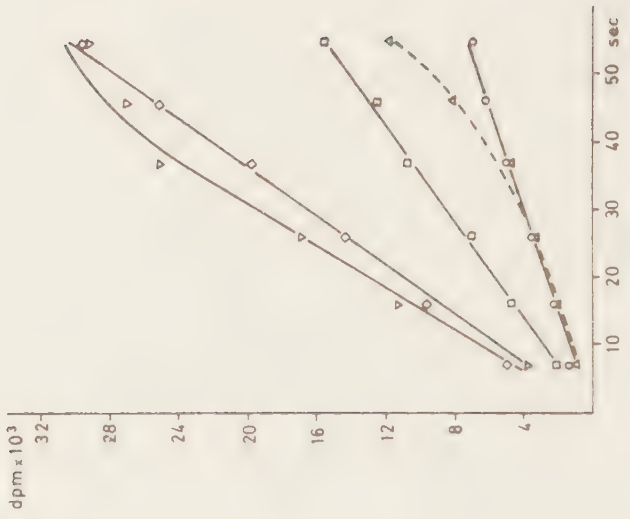


Fig. 20b

Fig. 20a, 20b: Kinetik der Gesamtfixierung und der ¹⁴C-Markierung der wichtigsten Stoffwechselprodukte (O_2 -Konzentration: 669 $\mu M/l$)

- Δ—Δ: Gesamtfixierung
- O—O: Glykolaldehyde
- : Zuckerdiphosphate
- ▽—▽: Zuckermonophosphate
- ◇—◇: 3-PGS
- Δ--Δ: Ribosephosphate

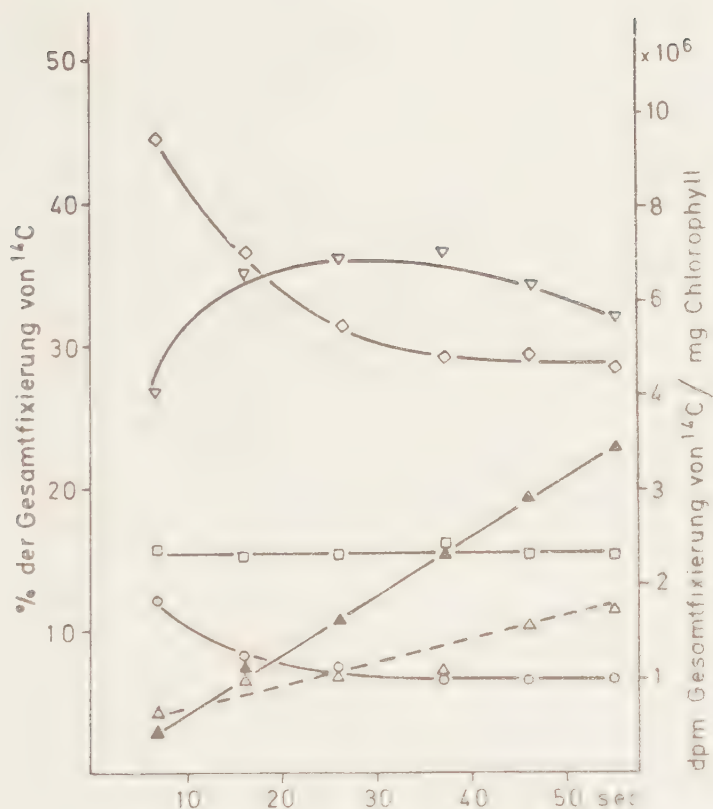


Fig. 20c: Prozentuale Anteile von Glykolsäure und anderer wichtiger Stoffwechselprodukte am assimilierten ^{14}C (O_2 -Konzentration: $669 \mu\text{M/l}$)

- ▲—▲: Gesamtfixierung
- : % Glykolsäure
- : % Zuckerdiphosphate
- ▽—▽: % Zuckermonophosphate
- ◇—◇: % 3-PGS
- Δ---Δ: % Triosephosphate

Diese genannten Befunde stehen in Gegensatz zu Versuchen von HESS und TOLBERT (42), die bei Versuchen an intakten Tabakblättern einen nahezu konstanten prozentualen Anteil von radioaktiv markiertem Glykolat im Bereich von 4-300 Sekunden finden.

Der Abfall des Gehaltes an radioaktiv markierter Glykolsäure verläuft in etwa parallel zur Erniedrigung des prozentualen Anteils an 3-PGS. Diese Parallelität weist darauf hin, daß Glykolat aus einem sehr früh markierten Vorläufer entstehen muß. Es besteht sogar die Möglichkeit, daß 3-PGS und Glykolat ungefähr gleichzeitig markiert werden. Dies wäre ein Hinweis auf die von ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57) gefundene RuDP-Oxygenase-Reaktion, bei der RuDP unter O_2 -Aufnahme in 3-PGS und P-Glykolat gespalten wird. Die entstehende 3-Phosphoglycerinsäure würde sich natürlich mit der in der Carboxylierungsreaktion entstehenden vermischen, weshalb immer mehr Kohlenstoff in 3-PGS erscheint als in Glykolat. P-Glykolat wird offensichtlich sofort dephosphoryliert, denn es konnte keines auf den Chromatogrammen nachgewiesen werden.

3.3.2. Die ^{14}C -Markierung der einzelnen Kohlenstoffatome der Glykolsäure

In Fortführung der Kurzzeitkinetik sollten weitere Aufschlüsse über die Bildung der Glykolsäure durch Untersuchung der ^{14}C -Markierung der einzelnen Kohlenstoffatome erhalten werden. Die nach einer Kurzzeitfixierung von 9 Sekunden sowohl unter niedrigem als auch unter hohem O_2 -Partialdruck isolierte Glykolsäure wurde deshalb auf ihre Radioaktivitätsverteilung in den C-Atomen hin untersucht.

Zur Kontrolle diente Glykolat aus einer dreiminütigen $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung.

Beim chemischen Abbau der Glykolsäure ($^2\text{CH}_2\text{OH}-^1\text{COOH}$) (s. 2.14.) stellt der erste Oxidationsschritt die Decarboxylierung der Glykolsäure dar. Sinngemäß erfolgt beim zweiten Oxidationsschritt die Oxidation der im ersten Schritt gebildeten Ameisensäure (C-2) zu CO_2 .

Die Ergebnisse der Abbauten sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Aufgrund der Versuche von HESS und TOLBERT (42) an intakten Tabakblättern wäre bereits nach 4 Sekunden Photosynthese eine Gleichverteilung des ^{14}C auf die Kohlenstoffatome der Glykolsäure zu erwarten. Die Daten zeigen jedoch, daß das Kohlenstoffatom 2 der Glykolsäure rund die doppelte spezifische Radioaktivität aufweist wie das Kohlenstoffatom 1.

Tab. 3: Bestimmung der ^{14}C -Markierung der beiden Kohlenstoffatome der Glykolsäure
(nach 9 sec und 3 min $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung durch intakte Spinatchloroplasten)

Herkunft des Glykolats	Ausbeute 1.Oxid.- schritt [%]	Ausbeute 2.Oxid.- schritt [%]	cpm/mM BaCO_3 C-1 C-2	C-1 / C-2	^{14}C -Verteilung [%] C-1 C-2
9" $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -Fix. (90 μM O_2/l)	86	85	927 2660	1 : 2,86	25,9 74,1
9" $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -Fix. (669 μM O_2/l)	101	69	1286 2827	1 : 2,19	31,3 68,7
3' $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ -Fix. (700 μM O_2/l)	57	69	21466 21920	1 : 1,02	49,5 50,5

Nach drei Minuten Fixierungszeit (Kontrollwert) sind erwartungsgemäß beide C-Atome gleich stark markiert.

Diese Befunde sind im Hinblick auf mögliche Vorstufen bzw. Vorläufer für die Glykolsäure schwer zu erklären, da sie nur dann in eine der bisher aufgestellten Theorien über den Einbau von Radiokohlenstoff in die C-Atome der Glykolsäure passen, wenn man annimmt, daß die ^{14}C -Markierung der Kohlenstoffatome der Zuckerphosphatmoleküle anders oder zumindest wesentlich langsamer erfolgt als in vivo. Das Markierungsmuster entspricht demjenigen bei Alpen (78) (s. Tab.6).

3.3.3. Vergleich der Vorläufereffektivität verschiedener Vorläuferverbindungen für die Bildung von Glykolsäure bei niedrigem und hohem CO_2 -Partialdruck

Um die für die Bildung von Glykolsäure effektivsten Vorläuferverbindungen zu ermitteln, wurden verschiedene in Frage kommende Substanzen an ein rekonstituiertes Chloroplastensystem appliziert (70) (s. 2.4., 2.15.6.).

Für diese Versuche mußten aufgebrochene Chloroplasten verwendet werden, um eine unterschiedliche Permeation der exogen zugegebenen Substanzen und damit eine Verfälschung der Einbauraten zu vermeiden. Es wurden Konkurrenzversuche durchgeführt, d.h. in jedem Ansatz war die gleiche Mi-

sung von möglichen Vorläuferverbindungen enthalten, von denen aber jeweils nur eine radioaktiv markiert war.

Die im Glykolat gefundene Radioaktivität ist dann mit der Wirksamkeit der radioaktiv markierten Vorläuferverbindung gleichzusetzen. Die Versuchsdauer wurde auf 90 Sekunden beschränkt, um die durch die Chloroplastenenzyme bewirkte Umwandlung der applizierten Zwischenprodukte ineinander möglichst gering zu halten. Der photosynthetische Elektronenfluß wurde durch Zusatz von NADP ($1 \mu\text{M}$) aufrechterhalten.

Die Ergebnisse dieses Versuches, die Durchschnittswerte von zwei verschiedenen Experimenten darstellen, sind in Tab.7 zusammengestellt.

Der Versuchsansatz umfaßt beide im Chloroplasten vermutete Glykolatsynthesewege:

1. Die Bildung von Glykolat durch Reduktion von Glyoxylsäure
2. Die Bildung von Glykolat aufgrund eines oxidativen Vorganges aus Zuckerphosphaten oder 3-PGS.

Die in der Tab.7 angegebenen Werte der Glykolatbildung aus Glyoxylat dürften nicht den Verhältnissen in intakten Chloroplasten entsprechen, da nach der derzeitigen Kenntnis in isolierten Chloroplasten kein Glyoxylat synthetisiert wird. In vivo wird die Glyoxylsäure in den Peroxisomen

Tab.7: Bildung von Glykolsäure (nM/mg Chlorophyll x 90 sec)
aus verschiedenen möglichen Vorläuferverbindungen
bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Radioaktiv markierte Vorläuferverbindung	Sauerstoffkonzentration	
	55 - 72 $\mu\text{M O}_2/1$	585 $\mu\text{M O}_2/1$
Glycerat-3-Phosphat	5,3 $\pm$ 1,4	7,4 $\pm$ 0,5
Fructose-1,6-diphosphat	55,5 $\pm$ 1,2	47,1 $\pm$ 1,2
Sedoheptulose-1,7-diphosphat	17,5 $\pm$ 4,6	30,5 $\pm$ 2,8
Ribulose-1,5-diphosphat	76,0 $\pm$ 10,5	125,0 $\pm$ 15,3
Glucose-6-Phosphat	47,4 $\pm$ 0,0	47,7 $\pm$ 0,6
Fructose-6-Phosphat	82,8 $\pm$ 8,7	69,0 $\pm$ 2,4
Ribose-5-Phosphat	40,8 $\pm$ 2,5	32,8 $\pm$ 6,5
Glyoxylsäure	1102,0 $\pm$ 208,0	902,0 $\pm$ 150,0

gebildet; inwieweit sie von diesen Organellen in die Chloroplasten "zurückkehrt", ist unbekannt. Jedoch dürfte die Menge nicht allzu groß sein, da in den Peroxisomen andere glyoxylatverbrauchende Reaktionen (Oxidation, Decarboxylierung, Aminierung) ablaufen. Zudem könnte das aufgrund des NADP-Zusatzes vorhandene Überangebot an NADPH_2 die Glyoxylatreduktion im Vergleich zu In-vivo-Bedingungen unverhältnismäßig stark begünstigen.

Für die Glykolatbildung auf oxidativem Wege lassen sich die applizierten Verbindungen entsprechend ihrer Vorläufereffektivität in drei Gruppen einteilen:

1. 3-PGS und SDP sind bei beiden O_2 -Konzentrationen nur schwache Vorläufer.

2. Ein deutlich besserer ^{14}C -Einbau in Glykolat erfolgt aus FDP, Gluc-6-P und R-5-P.

Jede dieser letztgenannten Verbindungen kann für die Bildung von 9-17 % des gesamten auf oxidativem Wege entstandenen Glykolats verantwortlich gemacht werden.

3. F-6-P und RuDP sind bei beiden O_2 -Konzentrationen die besten Vorläuferverbindungen.

Für die O_2 -abhängige Glykolatbildung kommt aber nur RuDP in Frage. Es dürfte hier das spezifische Substrat sein, da nur bei Applikation von RuDP ein Einfluß des exogenen Sauerstoffs auf die Glykolsäurebildung zu beobachten ist.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der beiden glykolsäure- bildenden Reaktionen

4.1.1. Die von exogenem Sauerstoff unabhängige Bildung der Glykolsäure (Reaktion "A")

Die Versuche an isolierten, intakten Spinatchlo-
roplasten zeigen bei sättigendem CO_2 -Angebot und
niedrigem O_2 -Partialdruck eine von exogenem Sauer-
stoff unabhängige Bildung an Glykolsäure (s.Fig.5).
Diese Glykolatsynthesereaktion (Reaktion "A") ließ
sich bis zu einem unteren O_2 -Gehalt der Chloropla-
stensuspension von 8 und einem oberen von $120 \mu\text{M O}_2/\text{l}$
nachweisen. Bereiche unterhalb $8 \mu\text{M O}_2/\text{l}$ ließen sich
aus versuchstechnischen Gründen nicht untersuchen,
sodaß darüber keine Aussagen gemacht werden können.

Da die Glykolatproduktion im Bereich von
8 bis ca. $120 \mu\text{M O}_2/\text{l}$ keine Abhängigkeit von der
 O_2 -Konzentration der Suspension zeigt, ist eine
Bildung der Glykolsäure auf enzymatischem Wege in
diesem Bereich auszuschließen, wenn nicht das
Enzym bereits bei einem Sauerstoffgehalt von
 $8 \mu\text{M O}_2/\text{l}$ gesättigt ist.

4.1.2. Die sauerstoffabhängige Bildung der Glykolsäure (Reaktion "B")

Untersucht man die Bildung von Glykolsäure bei höheren O_2 -Partialdrücken als $120 \mu M O_2/l$ und bei sättigendem CO_2 -Angebot, so läßt sich eine lineare Zunahme des prozentualen Anteils des Glykolats am assimilierten Kohlenstoff feststellen. Diese Reaktion (Reaktion "B") entspricht weitgehend den Befunden vieler Arbeitsgruppen (26, 30, 31, 89, 95).

Es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß die Reaktion "A" als solche unter höheren O_2 -Partialdrücken gehemmt wird. Deshalb kann man annehmen, daß sie bei verstärktem exogenen O_2 -Angebot zunehmend von der O_2 -abhängigen Reaktion "B" überlagert und maskiert wird. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß durch den Warburg-Effekt (85) die CO_2 -Fixierung und damit zumindest das Angebot an Kohlenstoffquellen stark reduziert wird, so daß bereits von diesem Gesichtspunkt her die Reaktion "A" nicht allein für die Glykolatbildung unter hohem O_2 -Partialdruck verantwortlich sein kann.

4.1.3. Abhängigkeit der Reaktionen "A" und "B" vom CO₂-Angebot

Die Glykolatproduktion ist in vivo nicht nur abhängig vom O₂-Partialdruck, sondern auch vom CO₂-Angebot (19, 38, 67, 86); je höher die verwendete CO₂-Konzentration ist, desto geringer ist der Anteil des fixierten Kohlenstoffs, der in Glykolat eingebaut wird. Dieser Befund konnte mit den hier beschriebenen Versuchen auch für isolierte Chloroplasten bestätigt werden (Fig.11, 12).

Allerdings änderte sich der Prozentsatz an radioaktiv markiertem ¹⁴C-Glykolat bei Variation des CO₂-Angebotes nur so lange, wie dies auch bei der CO₂-Fixierung der Fall war.

Variiert man nun bei limitierendem CO₂-Angebot die O₂-Konzentration, so läßt sich ebenfalls die von exogenem Sauerstoff unabhängige Reaktion "A" feststellen; allerdings wird sie hier bereits bei sehr niedrigen O₂-Partialdrücken von der Reaktion "B" überlagert (s. Fig.13), die im Vergleich zu sättigendem CO₂-Angebot wesentlich gefördert ist.

Die Unterscheidung zwischen Reaktion "A" und "B" wird schwieriger, wenn man nicht die prozentualen Anteile, sondern die Mengen der gebildeten Glykolsäure betrachtet. Da bei zunehmendem Sauer-

stoffgehalt der Suspension die CO_2 -Fixierung immer stärker gehemmt wird (Warburg-Effekt) (85), nehmen auch die für die Bildung von Glykolsäure verfügbaren Mengen an Vorläuferverbindungen ab. So müßte die in den Reaktionen "A + B" gebildete Glykolatmenge nicht notwendig größer sein, als die nur durch die Reaktion "A" entstandene.

Allerdings war fast immer unter den die Reaktionen "A + B" begünstigenden O_2 -Konzentrationen eine zumindest geringfügige Steigerung der Glykolatsynthese zu beobachten. Eine deutliche Unterscheidung erlaubt aber nur die prozentuale Darstellung, da hierbei der Einfluß des Warburg-Effekts nicht zum Tragen kommt.

Eine unter den Bedingungen für die Reaktionen "A + B" im Vergleich zu den Bedingungen für die Reaktion "A" allein mengenmäßig wenig gesteigerte Glykolatproduktion könnte zu dem Einwand führen, daß es sich nur um e i n e Reaktion der oxidativen Glykolatsynthese handelt. Dieser Einwand kann mit folgenden Argumenten entkräftet werden:

1. Die Reaktion "A" ist von exogenem Sauerstoff unabhängig und nur schwach abhängig vom Angebot an CO_2 .
2. Die Reaktion "B" ist sowohl vom exogen angebotenen Sauerstoff als auch vom Angebot an CO_2

stark abhängig.

3. Trotz abnehmender CO_2 -Fixierung aufgrund des Warburg-Effekts nehmen der prozentuale Anteil und meist auch die gebildete Menge an Glykolsäure im Bereich der Reaktion "B" zu.

4. Trägt man die prozentualen Anteile der Glykolsäure am fixierten Kohlenstoff gegen den O_2 -Partialdruck der Chloroplastensuspension auf, so ergibt sich bei den verschiedensten Versuchsbedingungen (Rotlicht-Weißlicht, sättigendes CO_2 -Angebot - CO_2 -Mangel) immer wieder die zweiphasige Kurve der Reaktionen "A" und "A + B".

4.2. Die Kohlenstoffquellen der Reaktionen "A" und "B"

4.2.1. Die Selektivitätsverteilung an den Kohlenstoffatomen der Glykolsäure nach kurzzeitiger $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung

Neben der physiologischen Charakterisierung der oxidativen Glykolatbiosynthese sollten die an den gefundenen Reaktionen "A" und "B" beteiligten Reaktionspartner ermittelt werden. Im folgenden werden zuerst die Versuche zur Feststellung der Kohlenstoffquellen für die Glykolsäurebildung besprochen.

Hinweise auf mögliche Vorläuferverbindungen soll-

ten zunächst mit Kurzzeitkinetiken der ^{14}C -Markierung des Glykolats (unter niedrigem und hohem O_2 -Partialdruck) erhalten werden. Wie die Ergebnisse (s. 3.3.1.) zeigen, scheint Glykolsäure aus sehr schnell markierten Vorläufern zu entstehen. Dieser Befund scheint zunächst im Widerspruch zu den Daten von BASSHAM und JENSEN (7) zu stehen, die eine späte Markierung des Glykolats finden. Unterschiede vor allem im Pflanzenmaterial und in der Versuchsdurchführung dürften für diese Diskrepanz verantwortlich sein, was auch dadurch zum Ausdruck kommt, daß der Einbau von ^{14}C in Glykolat in den Versuchen von BASSHAM und JENSEN (7) vergleichsweise gering ist. Das hier vorgelegte Ergebnis spricht jedoch nicht gegen die vermutete Bildung von Glykolat aus Zuckerphosphaten, da letztere bereits bei der ersten Probenentnahme stärker ^{14}C -markiert waren als Glykolsäure.

Weitere, genauere Anhaltspunkte über die Vorläuferverbindungen sind von der Kenntnis der Radioaktivitätsverteilung auf die einzelnen Kohlenstoffatome der Glykolsäure nach sehr kurzen Fixierungszeiten zu erwarten.

Die in Tab.6 aufgezeigten Befunde über den Einbau von Radiokohlenstoff in die C-Atome der Glykolsäure sind im Hinblick auf mögliche Vorläufer-

verbindungen zunächst schwer zu erklären, da sie nicht den in der Literatur (42) beschriebenen Verteilungsmustern für Landpflanzen (C-1 : C-2 = 1 : 1), sondern denen für Algen entsprechen (78).

Versuche von BASSHAM und CALVIN (6) zeigen aber, daß nach $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierungszeiten von 0,4 Sekunden bei Sojabohnenblättern die Hauptmarkierung von SDP am C-3 und C-5 zu finden ist. Wird dieses SDP nun von der Transketolase gespalten, so entsteht ein schwach markierter C_2 -Körper und R-5-P mit starken Markierungen des C-1 und C-3 und schwächerer Markierung in C-2.

Durch Isomerisierung und Phosphorylierung kann aus R-5-P RuDP gebildet werden, das mit Hilfe der RuDP-Oxygenase (1, 57) gespalten werden kann. Bei dieser Reaktion entsteht P-Glykolat mit der Hauptmarkierung in C-2 (= C-1 der Pentose) und geringer Radioaktivität in C-1 (= C-2 der Pentose).

Wird dieses RuDP in Anwesenheit von $^{14}\text{CO}_2$ carboxyliert und reduziert, so entsteht über FDP F-6-P, das zwar vor allem Radiokohlenstoff in C-3 und C-4 enthält, aber auch die unterschiedliche Markierung der Kohlenstoffatome 1 und 2 des ursprünglichen RuDP in den Positionen 1 und 2 bzw. 5 und 6 aufweist.

Wird der von diesem F-6-P in der Transketolase-

Reaktion gebildete aktivierte Glykolaldehyd (26, 29, 31) zu Glykolsäure oxidiert, so entsteht ein Molekül, dessen Kohlenstoffatom C-2 etwa doppelt so stark radioaktiv markiert ist wie C-1.

Es kommen als direkte Vorläufer also in erster Linie 1. RuDP sowie 2. F-6-P und Xylulose-5-Phosphat (aus R-5-P durch Isomerisierung und Epimerisierung gebildet) in Frage.

Versuche von BRUIN et al. (17) und CHANG und TOLBERT (22) an Chlorella und Chlamydomonas könnten diese Ergebnisse bestätigen. Die hier diskutierten Befunde sprechen selbst nur insoweit für zwei verschiedene Substrate für die Reaktionen "A" und "B", als das Verhältnis der Markierung von C-1 : C-2 von Glykolsäure unter niedrigem und hohem O_2 -Partialdruck etwas verschieden ist (1 : 2,9 und 1 : 2,2) (s. Tab.6).

Weiterhin läßt die gefundene Ungleichmarkierung der C-Atome der Glykolsäure auf einen verzögerten Kohlenstoffaustausch durch die Reaktionen des Calvin-Zyklus schließen.

4.2.2. Aktivierter Glykolaldehyd und Ribulose-1,5-
diphosphat als Kohlenstoffquellen der oxida-
tiven Glykolatsynthese in isolierten Chlo-
roplasten

Hinsichtlich der oxidativen Glykolatbildung zeigt die Tab.7 eine 11prozentige Steigerung der Glykolatsynthese unter den Bedingungen der Reaktion "A + B" gegenüber denen für die Reaktion "A" allein. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie bei Verwendung intakter Chloroplasten. Das Ergebnis war jedoch insofern nicht erwartet, als in dem verwendeten rekonstituierten Chloroplastensystem die Substrate für die Glykolatbildung nicht limitierend sind, wie dies bei intakten Spinatchloroplasten der Fall ist. Bei letzteren tritt nach Zugabe von exogenem Sauerstoff der Warburg-Effekt auf, der einen Mangel an Zuckerphosphaten im Chloroplasten zur Folge hat. Der exogen zugegebene Sauerstoff sollte also im rekonstituierten Chloroplastensystem eine größere Wirksamkeit besitzen. Die gefundenen Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß in dem verwendeten System entweder der Oxidant selbst oder eines der glykolsäureproduzierenden Enzyme limitierend sein könnte (4, 5).

Wie in 3.3.3. beschrieben, lassen sich die applizierten Vorläuferverbindungen in bezug auf ihre Effektivität in drei Gruppen einteilen:

1. 3-PGS und SDP sind bei beiden O_2 -Konzentrationen wenig wirksame Vorläuferverbindungen.
2. Die Glykolatsynthese aus FDP, Gluc-6-P und R-5-P ist jeweils etwa gleich, aber doch wesentlich geringer als die aus RuDP und F-6-P.
3. Der effektivste Einbau von ^{14}C in Glykolsäure auf oxidativem Wege erfolgt von RuDP und F-6-P aus. O_2 -partialdruckabhängig ist allein derjenige aus RuDP.

Dies läßt vermuten, daß dieser ^{14}C -Einbau über die von ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57) beschriebene RuDP-Oxygenase erfolgt.

Zwischenprodukt soll ein instabiles Peroxid sein. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Fig.21 dargestellt.

Die oben genannte insgesamt gesehen geringe Stimulierung der Glykolatsynthese durch exogenen Sauerstoff könnte also z.B. auf eine Hemmung der RuDP-Oxygenase-Aktivität zurückzuführen sein.

Tatsächlich konnte eine drastische Hemmung (75 %) dieser Aktivität kurz nach dem Aufbrechen der Chloroplasten gezeigt werden (25).

^{14}C aus F-6-P wird unter niedrigem und hohem O_2 -Partialdruck etwa gleich gut eingebaut. Dies ist

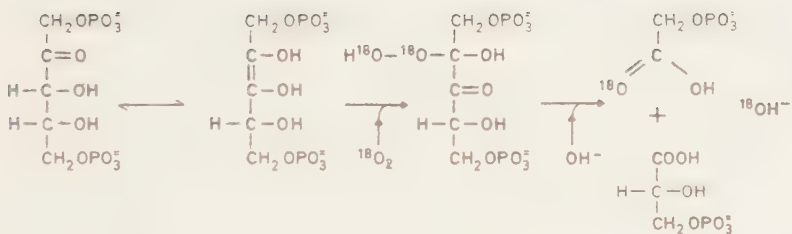


Fig.21: Reaktionsmechanismus der Glykolatbildung aus Ribulose-1,5-diphosphat nach ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57)

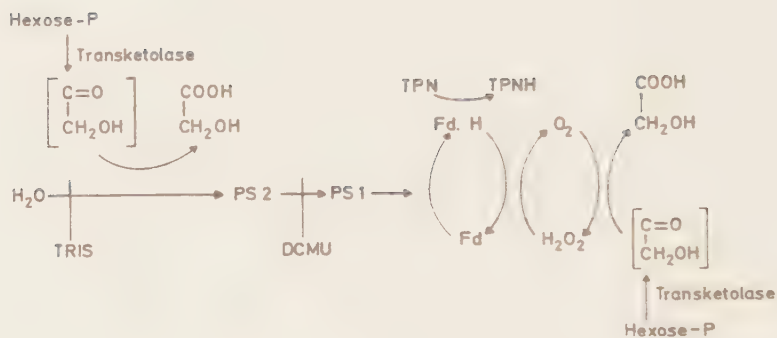


Fig.22: Reaktionsmechanismus der Glykolatbildung aus aktiviertem Glykolaldehyd nach SHAIN und GIBBS (70)

ein weiterer Hinweis auf die Hypothese, daß die Reaktion "A" gleichzeitig bei hohem O_2 -Partialdruck abläuft, jedoch lediglich von der Reaktion "B" überlagert wird. Die Reaktion "A" scheint zunächst hinsichtlich der Kohlenstoffquelle substratunspezifischer zu sein.

Aber die Tatsache, daß F-6-P ein wirksamerer Vorläufer als FDP ist, unterstützt die von SHAIN und GIBBS (70) vertretene Meinung, daß nicht das Zuckerphosphat selbst, sondern der aus ihm gebildete aktivierte Glykolaldehyd der unmittelbare Vorläufer für Glykolsäure sei. Dieser entstünde aus F-6-P (Xylulose-5-Phosphat und S-7-P) über die Transketolase-Reaktion (s. Fig.22).

Der schlechtere Einbau von ^{14}C aus FDP oder Gluc-6-P wäre dann dadurch zu erklären, daß diese Verbindungen zuerst dephosphoryliert bzw. isomerisiert werden müssen, um die Ausgangssubstanz F-6-P zu bilden.

Die relativ schwache Vorläuferwirksamkeit von SDP verglichen mit FDP als Vorläuferverbindung für Glykolsäure könnte auf eine verschieden hohe Aktivität der beiden C-1-Phosphatasen dieser Zuckerphosphate zurückzuführen sein (53). Die Aktivität dieser Phosphatasen läßt sich aus der während der Inkubationszeit gebildeten Menge an S-7-P und F-6-P schließen (5 % S-7-P aus SDP, 8 % F-6-P aus FDP).

Aus R-5-P kann Glykolsäure auf zwei verschiedenen Wegen gebildet werden:

Einmal kann R-5-P isomerisiert und anschließend phosphoryliert werden. Das entstandene RuDP sollte dann mit Hilfe der RuDP-Oxygenase gespalten werden und P-Glykolat ergeben. Zum anderen kann R-5-P isomerisiert und epimerisiert werden. Von dem so gebildeten Xylulose-5-Phosphat kann der aktivierte Glykolaldehyd abgespalten werden, der dann ebenfalls Glykolsäure ergibt.

Die Versuche zeigten, daß aus R-5-P bei beiden O_2 -Partialdrücken etwa 5 % RuDP gebildet wurden (entsprechend 260 nMol RuDP/mg Chlorophyll).

Der Restgehalt an RuDP betrug nach einer Versuchszeit von 90 Sekunden 3,29 μ Mol bzw. 3,63 μ Mol/mg Chlorophyll.

Um nun eindeutig die Glykolatmenge, die aus R-5-P via RuDP entstanden ist, zu bestimmen, wurde folgende Gleichung benützt:

$$\text{nMol Glykolat}_{\text{R-5-P}} = \text{nMol Glykolat}_{\text{RuDP}} \times \frac{\text{nMol RuDP}_{\text{R-5-P}}}{\text{nMol RuDP}_{\text{RuDP}}}$$

Setzt man in die Gleichung die entsprechenden Werte ein, so ergibt sich, daß bei niedrigem O_2 -Partialdruck 6,0 und bei hohem 9,0 nMol Glykolat/mg Chlorophyll x 90 sec aus R-5-P via RuDP gebildet wurden.

Subtrahiert man diese Werte vom insgesamt aus R-5-P gebildeten Glykolat, so zeigt sich, daß

wesentlich mehr Glykolat_{R-5-P} aus aktiviertem Glykolaldehyd als über RuDP entstanden sein muß.

Da es sich bei den hier beschriebenen Experimenten um Konkurrenzversuche handelt, bei denen alle Substanzen gleichzeitig zugesetzt wurden, läßt sich die Bildung von Glykolsäure auf oxidativem Wege aus aktiviertem Glykolaldehyd einerseits und aus RuDP andererseits annähernd durch folgende Beziehungen bestimmen:

$$\text{Glykolat}_{\text{Reaktion "A"}} = \text{Glykolat}_{(\text{F-6-P} + \text{Gluc-6-P} + \text{FDP} + \text{SDP} + \text{R-5-P} - \text{R-5-P}_{\text{RuDP}})}$$

$$\text{Glykolat}_{\text{Reaktion "B"}} = \text{Glykolat}_{(\text{RuDP} + \text{R-5-P}_{\text{RuDP}})}$$

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tab.8 dargestellt.

Die in Tab.8 angegebenen Werte zeigen deutlich, daß die Glykolatsynthese aus aktiviertem Glykolaldehyd unabhängig ist vom O₂-Partialdruck, während die aus RuDP bei großem Sauerstoffangebot um fast das Doppelte gesteigert wird.

Die gleichbleibende Rate könnte auch durch eine Limitierung der Reaktion durch die Transketolase erklärt werden, jedoch ergaben Versuche von SCHEIBE (68) eine Aktivität dieses Enzyms von 5,85 µM/mg Chlorophyll x 90 sec, während die Glykolatproduktion nur etwa 0,25 µM/mg Chlorophyll x 90 sec betrug.

Tab.8: Glykolatproduktion (nMol/mg Chlorophyll
x 90 Sekunden) aus aktiviertem Glykol-
aldehyd bzw. Ribulose-1,5-diphosphat
bei verschiedenen O₂-Konzentrationen

Vorläufer- verbindung	Sauerstoffkonzentration	
	55 - 72 µMol O ₂ /l	585 µMol O ₂ /l
aktiv. Gly- kolaldehyd	238 ± 17,0	218 ± 11,4
Ribulose-1,5- diphosphat	82 ± 10,5	134 ± 17,4

Die Aktivität der RuDP-Oxygenase dürfte nach den anfangs zitierten Beobachtungen in vivo etwa mit dem Faktor 4 multipliziert werden.

Die Interpretation des Konkurrenzversuches ergibt also, daß die von exogenem Sauerstoff unabhängige Reaktion "A" der Glykolsäurebildung die Oxidation des aktivierten Glykolaldehyds darstellt; die Kohlenstoffquelle der von exogenem Sauerstoff abhängigen Reaktion "B" ist RuDP.

4.3. Die Oxidanten in der Glykolatsynthese

Der Umstand, daß die Reaktion "B" der von ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57) beschriebenen RuDP-Oxygenase-Reaktion entspricht, läßt als Oxidanten der Reaktion "B" O_2 erwarten (s. Fig.21). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß RuDP oder R-5-P zusätzlich, ebenfalls auf nicht enzymatischem Wege, noch oxidativ gespalten werden kann. Dabei könnte auch reduziertes O_2 als Oxidant wirken. Allerdings fand WILDNER (91) nach H_2O_2 -Behandlung des RuDP-Carboxydismutase-Komplexes kein P-Glykolat oder Glykolat.

Der Oxidant der Reaktion "A" ist noch unbekannt. Sicher ist jedoch, daß die Oxidation nicht auf eine unspezifische Photooxidation durch Blaulicht zurückzuführen ist. Dies zeigen die in 3.2.3. be-

schriebenen Versuche mit Rotlicht.

Nach Meinung von GIBBS (31) könnte der Oxidant auf eine bisher unbekannte Weise im Photosystem II gebildet werden. Wäre der Oxidant der Reaktion "A" direkt an das Photosystem II gekoppelt, dann sollten bei Aufnahme einer Lichtsättigungskurve die prozentualen Anteile der Glykolsäure von der Lichtintensität unabhängig sein, da der Oxidant immer im gleichen Maße gebildet würde. Entsprechende Versuche von STEIGER (73) konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen.

Es bleibt zu diskutieren, inwieweit eine Species des photosynthetisch reduzierten Sauerstoffs als Oxidant in Frage kommt (27, 28). Wenn man den Weg des Elektrons vom reduzierten Ferredoxin aus betrachtet, muß man mit drei möglichen Oxidanten rechnen (s. Fig.23).

Bei der durch Anstau von NADPH_2 ausgelösten Übertragung von Elektronen auf O_2 könnten nach ELSTNER und KRAMER (28) zum einen $\text{O}_2^{\bullet -}$ -Radikale entstehen, die dann noch durch Dismutation zum H_2O_2 reduziert (bzw. zu O_2 oxidiert) werden.

Nach HABER und WEISS (36) könnte weiterhin das Radikal $\text{O}_2^{\bullet -}$ mit H_2O_2 und H^+ unter Bildung eines $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikals und von H_2O und O_2 reagieren.

Diese Reaktionen sollten insofern vom exogenen Sauerstoff unabhängig sein, da die laufende

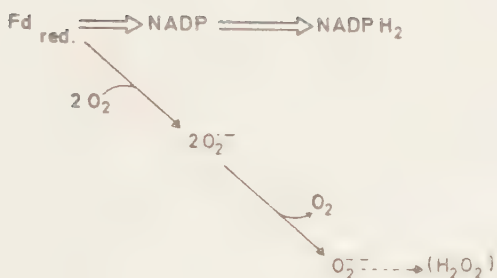


Fig.23: Mögliche Oxidanten bei der Glykolsäurebildung nach ELSTNER (27) und ELSTNER und KRAMER (28)

O_2 -Produktion auch bei beschleunigter O_2 -Diffusion aus dem Chloroplasten ins Medium genügend Sauerstoff liefert, der an oder innerhalb der Membran reduziert werden und somit Oxidant sein könnte.

Das Ausmaß der Oxidantenbildung würde somit vom verfügbaren NADP und, da ATP die Rate der CO_2 -Fixierung limitieren dürfte, vom Verhältnis ATP : $NADPH_2$ bestimmt.

Für einen Oxidanten in Form einer Species des reduzierten O_2 spricht auch der Befund, daß unter CO_2 -Mangel, also $NADPH_2$ -Anstau und verstärkter O_2 -Reduktion, die Glykolatsynthese bei niedrigem O_2 -Partialdruck durch Ascorbat gehemmt wird (55). Nach Ergebnissen von ELSTNER (27) hemmt Ascorbat die Bildung von $O_2^{\bullet -}$ und von H_2O_2 , so daß die geringere Glykolatsynthese auf die verringerte Bildung der Formen des reduzierten O_2 zurückgeführt werden könnte. Welche der Reaktionen in vivo dominiert, ist noch offen.

Messungen des Sauerstoffgehaltes im Chloroplasten könnten aber einen weiteren Schritt zur Beantwortung dieser Frage darstellen.

5. Zusammenfassung

1. Problemstellung

An isolierten, intakten Spinatchloroplasten war die Bildung von Glykolsäure bei der Photosynthese erstmals unter genau gemessenem O_2 -Partialdruck zu untersuchen. Damit sollte der Einfluß von O_2 auf die oxidative Glykolatsynthese exakt ermittelt werden, da die bisher veröffentlichten Daten wegen der Vernachlässigung des laufend photosynthetisch produzierten Sauerstoffs eine schlüssige Aussage nicht zuließen.

2. Die Reaktionen "A" und "B" bei der Glykolatsynthese

Es ergab sich der überraschende Befund, daß offensichtlich zwei Typen von oxidativ glykolatproduzierenden Reaktionen im photosynthetisierenden Chloroplasten ablaufen können, die als Reaktionen "A" und "B" bezeichnet wurden.

a) Die Reaktion "A" war bei sättigendem CO_2 -Angebot bis $120 \mu\text{Mol } O_2/l$ zu beobachten; bei ihr ist der Prozentsatz des in Glykolat eingebauten assimilierten Kohlenstoffs nicht vom O_2 -Partialdruck abhängig.

b) Die Reaktion "B" ist O_2 -konzentrationsabhängig und ab einem O_2 -Partialdruck von etwa $120 \mu\text{Mol } O_2/l$ zu beobachten. Hierbei steigt der Prozentsatz des ^{14}C -Einbaus in Glykolat linear mit dem O_2 -Partialdruck an.

Die Versuchsergebnisse lassen sich dahingehend deuten, daß die Reaktion "A" bei hohem O_2 -Partialdruck von der Reaktion "B" überlagert und maskiert wird.

3. Abhängigkeit beider Reaktionen vom CO_2 -Partialdruck

Die Reaktionen "A" und "B" sind auch bei nicht-sättigendem CO_2 -Angebot zu beobachten. Allerdings setzt die Reaktion "B" bei wesentlich niedrigeren O_2 -Konzentrationen ein (etwa bei $10-20 \mu\text{Mol } O_2/l$). Insgesamt zeigte sich, daß die Reaktion "A" vom CO_2 -Partialdruck kaum beeinflusst wird, während die Reaktion "B" durch ein limitierendes CO_2 -Angebot drastisch gesteigert und dann auch bereits bei niedrigeren O_2 -Partialdrücken beobachtet werden kann.

4. Beschreibung der Reaktionen

a) Ermittlung der Kohlenstoffquellen

^{14}C -Markierungskinetiken der Glykolsäure insgesamt sowie auch ihrer einzelnen Kohlenstoffatome wiesen darauf hin, daß es sich bei den Vorläuferverbindun-

gen der Glykolsäure um Produkte des Calvin-Zyklus handelt (wie auch in der Literatur vermutet) und daß die Glykolatsynthese nicht notwendigerweise an eine laufende CO_2 -Fixierung gebunden ist, sondern auch nach deren Aufhören nachzuweisen ist.

Die Überprüfung der Radioaktivitätsverteilung in den Kohlenstoffatomen der Glykolsäure läßt als direkte Vorläufer in erster Linie Ribulose-1,5-diphosphat sowie Fructose-6-Phosphat, Sedoheptulose-1,7-diphosphat und Xylulose-5-Phosphat wahrscheinlich erscheinen. Weiterhin läßt die gefundene Ungleichmarkierung der Kohlenstoffatome auf einen verzögerten Kohlenstoffaustausch durch die Reaktionen des Calvin-Zyklus schließen.

Genauere Aussagen wurden unter Verwendung eines rekonstituierten Chloroplastensystems durch gleichzeitige Applikation verschiedener möglicher Vorstufen, von denen jeweils eine radioaktiv markiert war, erzielt. Dabei ließen sich die applizierten Vorläuferverbindungen in bezug auf ihre Effektivität in drei Gruppen einteilen:

α) 3-Phosphoglycerinsäure und Sedoheptulose-1,7-diphosphat sind sowohl unter niedrigem als auch unter hohem O_2 -Partialdruck wenig wirksame Vorläuferverbindungen.

β) Die Glykolatsynthese aus Fructose-1,6-diphosphat, Glucose-6-Phosphat und Ribose-5-Phosphat ist jeweils etwa gleich, aber doch

wesentlich geringer als die aus Ribulose-1,5-diphosphat und Fructose-6-Phosphat.

γ) Der effektivste Einbau von ^{14}C in Glykolsäure erfolgt von Ribulose-1,5-diphosphat und Fructose-6-Phosphat aus. Dabei ist der Einbau von ^{14}C aus Fructose-6-Phosphat unabhängig vom O_2 -Partialdruck. Eine starke Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck zeigt dagegen der Einbau von ^{14}C aus Ribulose-1,5-diphosphat.

Die beschriebenen Versuche lassen als Kohlenstoffquelle für die Reaktion "A" den aktivierten Glykolaldehyd (der in der Transketolase-Reaktion z.B. aus Fructose-6-Phosphat entsteht), für die Reaktion "B" dagegen Ribulose-1,5-diphosphat wahrscheinlich erscheinen. Die Sauerstoffabhängigkeit der Reaktion "B" sowie das Substrat Ribulose-1,5-diphosphat lassen vermuten, daß es sich bei ihr um die von ANDREWS et al. (1) und LORIMER et al. (57) beschriebene Ribulose-1,5-diphosphat-Oxygenase-Reaktion handelt.

b) Mögliche Oxidanten

Bei dem in der Reaktion "B" wirksamen Oxidanten dürfte es sich im wesentlichen um O_2 selbst handeln; jedoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß Ribulose-1,5-diphosphat zusätzlich noch auf andere Weise gespalten werden kann.

Der Oxidant der Reaktion "A" ist bis jetzt noch unbekannt. Es gibt aber einige Hinweise darauf, daß es sich um eine oder mehrere Species des photosynthetisch reduzierten Sauerstoffs handeln könnte.

5. Anhang

Im Anhang wird ein eigenartiges Phänomen beschrieben, das im Zusammenhang mit diesen Arbeiten aufgetaucht ist, aber nicht direkt den Problemkreis der Glykolatsynthese berührt. Es konnte eine Steigerung der CO_2 -Fixierung durch isolierte, intakte Chloroplasten bei Erhöhung des O_2 -Partialdrucks im Bereich zwischen 8-100 $\mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ beobachtet werden. Bisher war nur der hemmende Einfluß auf die CO_2 -Fixierung bekannt (Warburg-Effekt), der in dem verwendeten Chloroplastensystem ab etwa 150 $\mu\text{Mol O}_2/\text{l}$ zu beobachten war. Es wird diskutiert, inwieweit eine mögliche O_2 -abhängige Adenosintriphosphat-Bildung für die Stimulierung der CO_2 -Fixierung durch Sauerstoff verantwortlich sein könnte.

6. Anhang

Versuche zur Erklärung der Optimumskurve der Gesamtfixierung von ^{14}C bei stufenweiser Er- höhung der O_2 -Konzentration

Bei allen Versuchen, bei denen der O_2 -Partialdruck bei konstantem CO_2 -Angebot variiert wurde, zeigte die Fixierungsrate ein deutlich ausgeprägtes Optimum (im Bereich zwischen $100\text{--}120\ \mu\text{M O}_2/\text{l}$) und nicht, wie zu erwarten, nur einen Abfall bei zunehmender O_2 -Konzentration (Warburg-Effekt (85)) (s. Fig.24, 13, 14).

Dem Optimum folgte dann entsprechend dem Warburg-Effekt allerdings der rasche Abfall der CO_2 -Fixierungsrate. Die Steigerung der Fixierungsrate im Bereich bis etwa $100\ \mu\text{M O}_2/\text{l}$ ließ zunächst vermuten, daß die Chloroplasten eine gewisse Stimulierung durch Sauerstoff für eine optimale CO_2 -Fixierung benötigen, wie sie auch CHAMPIGNY (21) annimmt.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Chloroplastensuspension in die Küvette des Oxigraphen gegeben und erst im Anschluß daran der in der Suspension befindliche exogene Sauerstoff

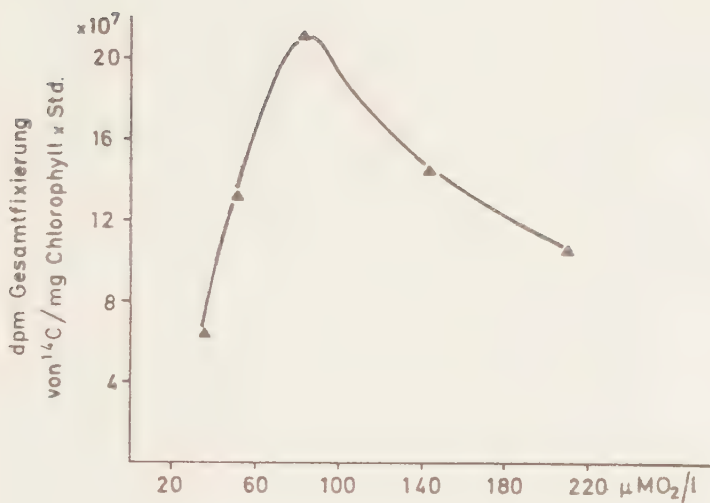


Fig.24: Gesamtfixierung von $^{14}\text{C}/\text{mg Chlorophyll} \times \text{Stunde}$ bei sättigendem CO_2 -Angebot in Abhängigkeit vom O_2 -Partialdruck

Tab.9: Stimulierung der Gesamtfixierung von ^{14}C durch kurzzeitigen Sauerstoffeinfluß

O ₂ -Konz. der Suspension [µM O ₂ /l]	Normaler Versuchsgang	Vorbehandelt	Steigerung [%]
	Gesamtfixierung [dpm x 10 ⁷ /mg Chl. x std.]	Gesamtfixierung [dpm x 10 ⁷ /mg Chl. x std.]	
23	69,7	106,3	+ 52
54	161,5	165,7	+ 3
120	161,7	179,2	+ 11
125	72,7	-	-

mit Stickstoff herausgespült. Bei dem üblichen Versuchsgang befanden sich dagegen die Chloroplasten in der Küvette sofort unter anaeroben Bedingungen (s. 2.6.).

Vergleicht man die Werte der Gesamtfixierung von ^{14}C dieser Proben mit denen, die in der üblichen Weise behandelt wurden, so läßt sich zumindest bei sehr niedrigen O_2 -Konzentrationen eine Stimulierung durch Sauerstoff feststellen (s. Tab.9).

Allerdings reicht das Ausmaß der gefundenen Stimulierung nicht zur Erklärung der Optimumskurve aus.

Der erste Teil der Optimumskurve ließe sich deshalb dahingehend interpretieren, daß im Bereich bis etwa $120 \mu\text{M O}_2/\text{l}$ eine O_2 -abhängige Photo-phosphorylierung gehemmt ist, was zur Folge hat, daß 3-PGS bzw. Ribulose-5-Phosphat nicht genügend reduziert bzw. phosphoryliert werden.

. Literaturverzeichnis

1. ANDREWS T.J., LORIMER G.H., TOLBERT N.E.:
Biochem. 12, 11 - 18 (1973)
2. ARNON D.I.: Plant Physiol. 24, 1 - 15 (1949)
3. ARNON D.I., WHATLEY F.R., ALLEN M.B.: BBA, 32,
47 (1959)
4. BAHR J.T., JENSEN R.G.: Plant Physiol. 53,
39 - 44 (1974 a)
5. BAHR J.T., JENSEN R.G.: BBRC, 57, 1180 - 1185
(1974 b)
6. BASSHAM J.A., CALVIN M.: The Path of Carbon
in Photosynthesis 34 - 44, Prentice
Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J.(1957)
7. BASSHAM J.A., JENSEN R.G. in: Harvesting the Sun,
Piedro A.I., Greer F.A., Army T.I. Editor,
Academic Press, New York, London,
79 - 110 (1967)
8. BASSHAM J.A., KIRK M.: BBRC, 2, 376 - 380 (1962)
9. BASSHAM J.A., KIRK M., JENSEN R.G.: BBA, 153,
211 - 218 (1968)
10. BECK E., KNAUPP I.: Zeitschr.f.Pflanzenphysiol.
72, 141 - 147 (1974)
11. BECK E., STRANSKY H., FÜRBRINGER M.: FEBS-
Letters, 13, 229 - 234 (1971)
12. BECKER J.D., DÖHLER G., EGLE K.: Zeitschr.f.
Pflanzenphysiol. 58, 212 - 221 (1968)

13. BENSON A.A., CALVIN M.: J.Expt.Bot. 1, 63 - 68
(1950)
14. BERGMAYER H.U.: Methoden der enzymatischen
Analyse, Verlag Chemie Weinheim/Berg-
straße (1970)
15. BOWES G., OGREN W.L., HAGEMAN R.H.: BBRC, 45,
716 - 722 (1971)
16. BRADBEER J.W., ANDERSON C.M.A. in: Biochemistry
of Chloroplasts Vol.II, Goodwin T.W.
Editor, Academic Press London 175 -
179 (1966)
17. BRUIN W.J., NELSON E.B., TOLBERT N.E.: Plant
Physiol. 46, 386 (1970)
18. BUCHANAN B.B., SCHÜRMANN P.: Journ. of Biol.Chem.
248, 4956 - 4964 (1973)
19. CALVIN M., BASSHAM J.A., BENSON A.A., LYNCH V.H.,
QUELLET C., SCHOU L., STEPKA W., TOL-
BERT N.E.: Symp.Soc.Exp.Biol. V,
284 - 305 (1951)
20. CHALKINS V.P.: Anal.Chem. 15, 762 - 763 (1943)
21. CHAMPIGNY M.L.: Persönliche Mitteilung 1973
22. CHANG W.H., TOLBERT N.E.: Plant Physiol. 46,
377 (1970)
23. COCKBURN W., WALKER D.A., BALDRY C.W.: Bio-
chem.J. 107, 89 (1968)
24. EICKENBUSCH J.D.: Zulassungsarbeit Universität
München 1971

25. EICKENBUSCH J.D., SCHEIBE R., BECK E.: Zeit-
schr.f.Pflanzenphysiol. (im Druck)
26. ELLYARD P.W., GIBBS M.: Plant Physiol. 44 ,
1115 - 1121 (1969)
27. ELSTNER E.F.: Persönliche Mitteilung 1975
28. ELSTNER E.F., KRAMER R.: BBA, 314, 340 (1973)
29. GIBBS M.: Ann.N.Y. Acad.Sci. 168, 356 (1969)
30. GIBBS M. in: Photosynthesis and Photorespira-
tion, Hatch M.D., Osmond C.B.,
Slatyer R.O. Editor, Wiley-Interscience,
New York, London, Sydney, Toronto
433 - 441 (1971)
31. GIBBS M.: Structure and Function of Chloroplasts
197 - 200, Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg, New York (1971)
32. GIBBS M., KINDEL P.K., BUSSE M.: Methods in
Carbohydrate Chemistry Vol.II, 496,
Academic Press, New York (1963)
33. GILCK H.: Dissertation Universität München 1972
34. GOULDING K.H., MERRETT M.J.: Journ. of Expt.
Bot. 18, 620 - 630 (1967)
35. GOULDING K.H., MERRETT M.J.: Planta 22, 321 - 327
(1968)
36. HABER F., WEISS I.: Proc.Soc.Ser.A, 147, 322 (1934)
37. HALL D.O.: Nature 235, 136 (1972)
38. HAN T.W., ELEY J.H.: Plant and Cell Physiol. 14,
285 - 291 (1973)

39. HELDT H.W.: Praktikumsvorschrift für das Physiologische Großpraktikum (1974)
40. HELDT H.W., SAUER F.: BBA, 234, 83 - 91 (1971)
41. HELDT H.W., WERDAN K.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 203 - 208 (1973)
42. HESS J.L., TOLBERT N.E.: Journ. of Biol. Chem. 241, 5705 - 5711 (1966)
43. HIRS C.H.W., MOORE S., STEIN W.H.: Journ. of Biol. Chem. 195, 669 (1952)
44. JENNINGS R., PORTI G.: Third International Congress on Photosynthesis, Weizmann Institute, Rehovot, Israel, 52 (1974)
45. JENSEN R.G., BASSHAM J.A.: Proc.Natl.Acad.Sci. US. 56, 1095 (1966)
46. KAUSS H., KANDLER O.: Zeitschr.f.Naturforsch. 19 b, 439 - 441 (1964)
47. KISAKI T., TOLBERT N.E.: Plant Physiol. 44, 242 (1969)
48. KREMSREITER W.: Zulassungsarbeit Universität München 1971
49. KOWALLIK U., KOWALLIK W.: Planta 84, 141 - 157 (1969)
50. KURSANLEITUNG FÜR DEN PFLANZENPHYSIOLOGISCHEN LEHRSTUHL des Bot.Inst. der Universität München (1972)
51. LAING W.A., OGREN W.L., HAGEMAN R.H.: Plant Physiol. 54, 678 - 685 (1974)

- . LARSSON C.: Third International Congress on
Photosynthesis, Weizmann Institute,
Rehovot, Israel, 61 (1974)
- . LATZKO E., GIBBS M.: Zeitschr.f.Pflanzenphysiol.
59, 184 - 194 (1968)
54. LATZKO E., KELLY G.J.: Fortschritte der Botanik, 36,
77 - 89 (1974)
55. LEHNER W.: Zulassungsarbeit Universität München
1975
56. LEWIS C.F., WEINHOUSE S.: Methods in Enzymology III,
Academic Press Inc., New York, 269 - 276
57. LORIMER G.H., ANDREWS T.J., TOLBERT N.E.: Bio-
chem. 12, 18 - 23 (1973)
58. MEHLER A.H.: Arch.Biochem.Biophys. 33, 65 - 77
(1951 a)
- . MEHLER A.H.: Arch.Biochem.Biophys. 34, 339 - 351
(1951 b)
60. MEHLER A.H., BROWN A.H.: Arch.Biochem.Biophys.
38, 365 - 370 (1952)
- . MILLER R.M., MEYER C.M., TANNER H.A.: Plant Phy-
siol. 38, 184 (1963)
- . MÜLLER M.: Dissertation Technische Universität
München 1972
- . ÖGREN W.L., BOWES G.: Nature (London), New Biol.
230, 159 (1971)
- . PATTERSON C.O.P., MYERS J.: Plant Physiol. 51,
104 - 109 (1973)

65. RANDALL D.D., TOLBERT N.E., GREMEL D.: Plant
Physiol. 48, 480 - 487 (1971)
66. RICHARDSON K.E., TOLBERT N.E.: Journ.Biol.Chem.
236, 1285 (1961)
67. ROBINSON J.M., GIBBS M.: Plant Physiol. 53,
790 - 797 (1974)
68. SCHEIBE R.: Persönliche Mitteilung 1975
69. SCHNARRENBERGER C., OESER A., TOLBERT N.E.: Plant
Physiol. 48, 566 - 574 (1971)
70. SHAIN Y., GIBBS M.: Plant Physiol. 48, 325 - 330
(1971)
71. SIMON H., FLOESS H.G.: Bestimmung der Isotopen-
verteilung in markierten Verbindungen
Bd. I, Springer-Verlag Berlin (1967)
72. SPENCER D., UNT H.: Austral.J.Biol.Sci. 18,
197 - 210 (1965)
73. STEIGER M.: Zulassungsarbeit Universität
München 1974
74. STILLER M.: Annu.Rev.Plant Physiol. 13, 151
(1962)
75. THANBICHLER A.: Dissertation Universität München
1973
76. TOLBERT N.E.: Persönliche Mitteilung 1974
77. TOLBERT N.E.: Symposia of the Society for Experi-
mental Biology 27, University Press,
Cambridge (1973)

78. TOLBERT N.E., NELSON E.B., BRUIN W.J. in:
Photosynthesis and Photorespiration,
Hatch M.D., Osmond C.B., Slatyer R.O.
Editor, Wiley-Interscience, New York,
London, Sydney, Toronto 506 - 513 (1971)
79. TOLBERT N.E., ZILL L.P.: J.Biol.Chem. 222, 895
(1956)
80. THOMPSON C.M., WHITTINGHAM C.P.: BBA, 143, 642
(1967)
81. TREVELYAN W., PROCTER D.D., HARRISON J.S.:
Nature (London) 166, 444 (1950)
82. WALKER D.A.: Biochem.J. 92, 22 c - 23 c (1964)
83. WALKER D.A.: New Phytol. 72, 209 (1973)
84. WALKER D.A., KOSCIUKIEWICZ K., CASE C.: New
Phytol. 72, 237 - 247 (1973)
85. WARBURG O.: Biochem.Zeitschr. 103, 188 - 217
(1920)
86. WARBURG O., KRIPPAHL G.: Zeitschr.f.Naturf. 15 b,
197 (1960)
87. WHITEHOUSE D.G., LUDWIG L.J., WALKER D.A.:
Journ.Expt.Bot. 22, 772 - 791 (1971)
88. WHITTINGHAM C.P.: The Mechanism of Photosyn-
thesis, Edward Arnold London, 32 - 44
(1974)
89. WHITTINGHAM C.P., COOMBS J., MARKER A.F.H. in:
Biochemistry of Chloroplasts Vol.II,
Goodwin T.W. Editor, Academic Press
London 155 - 173 (1967)

90. WHITTINGHAM C.P., PRITCHARD G.G.: Proc.Roy.Soc.
London, Ser.B, 157, 366 (1963)
91. WILDNER G.F.: Persönliche Mitteilung 1974
92. ZELITCH I.: Journ.Biol.Chem. 234, 459 (1959)
93. ZELITCH I.: Journ.Biol.Chem. 234, 3077 (1959)
94. ZELITCH I.: Journ.Biol.Chem. 240, 1869 (1965)
95. ZELITCH I.: Photosynthesis, Photorespiration and
Plant Productivity, Academic Press
New York (1971)
96. ZELITCH I.: Plant Physiol. 51, 299 - 305 (1973)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Beck am Botanischen Institut der Universität München angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für sein großes Interesse, viele wertvolle Anregungen und die Unterstützung, die er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. O. Kandler für die finanzielle Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. E. Latzko vom Chemischen Institut in Freising-Weihenstephan danke ich für seine Hilfe bei der Isolierung und Reinigung von Ribulose-5-Phosphat-Kinase.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Teuber vom Botanischen Institut der TU München möchte ich mich für die großzügige Überlassung von ^{14}C -Sedoheptulose-1,7-diphosphat bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Fräulein Dr. M. Senser vom Botanischen Institut der Universität München und Herrn Dr. G.F. Wildner von der Ruhr-Universität Bochum für zahlreiche Anregungen und praktische Hinweise.

Lebenslauf

Am 15. Oktober 1944 wurde ich, Jörg-Dietrich Werner Eickenbusch als Sohn des Buchprüfers Werner Eickenbusch und seiner Ehefrau Gudrun., geb. Lieber in Potsdam, Kreis Brandenburg geboren. Am 24. April 1945 fiel mein Vater.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Potsdam. Nach der Übersiedlung nach Augsburg wiederholte ich freiwillig die 5. Klasse der Volksschule und trat 1957 in das Realgymnasium (jetziges Peutingergymnasium) in Augsburg über, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium für Chemie und Biologie an der Technischen Universität München. Ich beendete das Studium im Frühjahr 1971 mit der Wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien.

Mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation begann ich im Juni 1971 am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Beck.

An diesem Institut war ich zunächst als Wissenschaftliche Hilfskraft und ab Juni 1972 als Verwalter der Dienstgeschäfte eines Wissenschaftlichen Assistenten tätig.

Seit September 1974 bin ich Studienreferendar am Josef-Hofmiller-Gymnasium in Freising.

Im Juli 1972 heiratete ich Fräulein Hannelore Doering.

